

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

ONTOGÉNIE DES CAPACITÉS CATABOLIQUES
ET DU MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE
AUX STADES EMBRYONNAIRES CHEZ LE LOUP TACHETÉ
(*ANARHICHAS MINOR*)

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ À
L'UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Comme exigence partielle du programme de
Gestion de la Faune et de ses Habitats

PAR
VÉRONIQUE DESROSIERS
B. SC. BIOLOGIE

Juin, 2005

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À RIMOUSKI
Service de la bibliothèque

Avertissement

La diffusion de ce mémoire ou de cette thèse se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire « *Autorisation de reproduire et de diffuser un rapport, un mémoire ou une thèse* ». En signant ce formulaire, l'auteur concède à l'Université du Québec à Rimouski une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de son travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, l'auteur autorise l'Université du Québec à Rimouski à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de son travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits moraux ni à ses droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, l'auteur conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont il possède un exemplaire.

REMERCIEMENTS

Cette partie de mon mémoire en est une importante. Elle me permet de faire un petit sourire aux gens qui ont pris une place significative pour moi au cours de mes études. J'aimerais à me relire dans plusieurs années et me remémorer ce petit bout de vie que fût la maîtrise !

Mes premiers remerciements vont à mon directeur, Pierre. Même s'il est vrai que les dialogues furent un peu « clairsemés » (obligations obligent !), ils furent Ô combien efficaces ! Quelques minutes passées en ta présence sont suffisantes pour faire renaître confiance et enthousiasme, plusieurs te le diront ! Ta passion à communiquer les dernières illuminations de ton esprit est un des souvenirs les plus précieux que je retiens de ces dernières années.

Hélène, merci pour ta confiance. C'est toi qui m'a initié aux joies du laboratoire...je ne l'oublierai pas ! J'espère sincèrement que ce n'est que le début d'une longue collaboration amicale et professionnelle ! Un salut à Sophie également, ma colocataire de bureau d'un moment, qui fut elle aussi une source d'inspiration et un exemple à suivre pour moi.

Un merci à ma codirectrice, Nathalie, qui a su réagir rapidement pour me ravitailler une seconde fois en ces petits trésors qu'étaient les œufs de Norvège. Ce fut un support indispensable dans les circonstances !

Une pensée spéciale pour Pierre Rioux, professeur de laboratoire, qui a pris une place significative lors de mon baccalauréat et qui a sans aucun doute influencé mon cheminement, par son implication sincère et sa patience à démystifier certains casse-têtes biochimiques !

Mariève, ma coéquipière de bac, de maîtrise (jusqu'à la toute fin... !), une amie fidèle, vraie, enrichissante de sa philosophie, une oreille et une épaule lors des moments un peu plus rudes...de même que victorieux ! Ce fut une belle complicité à travers laquelle nous avons appris beaucoup l'une de l'autre. Merci à toi et reste celle que tu es si bien ! À nos prochaines aventures !

Si tout ceci est évidemment l'aboutissement de beaucoup de travail personnel, le soutien me venant de mes proches fut inestimable. Tom, ce soutien fut peut-être inconscient ou instinctif, mais d'aucun temps je n'ai senti de reproche quant aux heures nombreuses passées devant les bouquins et l'ordinateur. Voilà un élément qui m'était indispensable pour progresser sainement...merci ! Pour terminer, des agriculteurs consciencieux vous dirons qu'une bonne terre constitue l'élément de base d'une culture florissante ... cette bonne terre, ce sont mes parents, qui ont su me communiquer leur amour du travail bien fait et de la persévérance, et dont les encouragements et l'intérêt portés à ce que j'entreprends ne manque jamais. Merci de tout cœur ! xxx

RÉSUMÉ

Cette étude porte sur l'ontogénie des capacités métaboliques aux stades embryonnaires chez le Loup tacheté (*Anarhichas minor*). À intervalles réguliers, soit du stade oeillé (350 degré jour d'incubation, stade 4) à la pré-éclosion (900 degré jour, stade 7), des mesures d'activités enzymatiques ont été réalisées sur des œufs fertilisés individuels provenant de 16 croisements différents. En plus des mesures du catabolisme des protéines et des triglycérides, les capacités de cinq voies métaboliques ont été estimées : la capacité à utiliser les polysaccharides (pyruvate kinase), les acides aminés (aspartate aminotransférase) et les acides gras (hydroxyAcyl-CoA déshydrogénase) pour la production d'énergie, ainsi que les modes de production d'énergie aérobie (citrate synthase) et anaérobie (lactate déshydrogénase). Des systèmes enzymatiques fonctionnels pour la dégradation des protéines et lipides, la glycolyse, le catabolisme des acides aminés et acides gras, le cycle de l'acide citrique et la glycolyse anaérobie ont pu être détectés. L'activité de chacune de ces voies augmentait de façon significative au cours du développement. Des ratios comparant l'évolution des voies aérobie et anaérobie, de même que l'évolution de la mobilisation des différents substrats énergétiques au cours du développement, ont été étudiés. La capacité de production énergétique par mode anaérobie augmentait significativement plus rapidement que par mode aérobie (LDH/CS : 4.23 ± 1.41 au stade 5 à 8.23 ± 3.57 au stade 7) et semblait mobiliser les polysaccharides de plus en plus avec le développement (LDH/PK : 0.86 ± 0.30 au stade 5 à 3.57 ± 1.43 au stade 7). Les ratios permettant de comparer les capacités relatives à utiliser les différents substrats (polysaccharides, acides aminés et acides gras) pour la production d'énergie présentaient une augmentation significativement plus lente de la capacité à utiliser les polysaccharides que les acides aminés (PK/AAT : 5.05 ± 2.45 au stade 4 à 1.25 ± 0.41 au stade 7), ainsi que les acides gras (PK/HOAD : 7.85 ± 3.50 au stade 5 à 4.12 ± 1.26 au stade 7). La capacité relative à mobiliser les polysaccharides en mode aérobie (ratio PK/CS) diminuait de façon significative au cours de l'ontogénie (5.09 ± 1.79 au stade 6 à 2.50 ± 0.86 au stade 7), alors que la mobilisation relative des acides aminés s'intensifiait (AAT/CS : 1.33 ± 0.52 au stade 5 à 1.96 ± 0.99 au stade 6). Des variations inter-familiales significatives ont pu être observée pour chacune des voies métaboliques. Aussi, l'observation d'une variabilité d'activité (CV) supérieure entre les croisements qu'au sein d'une même famille (CS, LDH, AAT et PK) suggère la possibilité d'un effet parental sur le métabolisme de l'œuf. Quelques relations linéaires significatives ont pu être établies entre les paramètres métaboliques et le taux de survie de l'œuf au stade oeillé (qui variaient de 2 à 95 %). Il s'agissait du cas de l'AAT et la CS au stade 4 ($r^2_{\text{AAT}}=0.264$ relation positive, $r^2_{\text{CS}}=0.093$ relation négative), la HOAD au stade 5 ($r^2_{\text{HOAD}}=0.091$ rel. nég.), la TRY au stade 7 ($r^2_{\text{TRY}}=0.133$ rel. nég.) et la LDH aux stade 6 et 7 ($r^2=0.153$ rel. pos., $r^2=0.195$ rel. nég., respectivement). Ces résultats suggèrent que les activités des enzymes étudiées pourraient constituer de bons indicateurs de qualité des œufs.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
RÉSUMÉ	iv
TABLE DES MATIÈRES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	ix
CHAPITRE PREMIER	
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
1.1 Introduction	1
1.1.1 Le Loup tacheté	7
1.2 Problématique	9
1.2.1 Études antérieures des caractéristiques fondamentales embryonnaires .	10
1.2.2 Un outil éventuel : les indicateurs de qualité	12
1.3 Objectifs	18
1.4 Méthodologie	19
1.4.1 Approche expérimentale	19
1.4.2 Rôle fonctionnel des enzymes étudiées	20

LISTE DES TABLEAUX

Table 1. Mass (g), protein content (mg) and activity of enzymes of energy metabolism and catabolic capacities (U g^{-1} protein) in individual Spotted wolffish eggs during embryonic development (SE=standard error)	38
---	----

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Evolution of the a) anaerobic vs aerobic and b) anaerobic vs glycolytic pathways during embryonic development in <i>A. minor</i>	39
Figure 2. Relative evolution of the use of energy fuels (carbohydrates <i>PK</i> , amino acids <i>AAT</i> , fatty acids <i>HOAD</i>) during embryonic development in <i>A. minor</i> ...	39
Figure 3. Relative contribution of a) carbohydrates, b) amino acids and c) fatty acids to aerobic energy production during embryonic development in <i>A. minor</i> ...	40
Figure 4. Inter-familial variability in activities of a) LDH and b) PK during embryonic development in <i>A. minor</i>	40

LISTE DES ABRÉVIATIONS

BCDA	Bureau du Commissaire au Développement de l'Aquaculture
MAPAQ	Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec
TRY	Protéases trypsiniques
LIP	Triglycéride lipase
PK	Pyruvate kinase
AAT	Aspartate aminotransférase
GDH	Glutamate déshydrogénase
HOAD	HydroxyAcyl-CoA déshydrogénase
CS	Citrate synthase
LDH	Lactate déshydrogénase
RPM	Rotation(s) par minute
U	Unité d'activité enzymatique
Nm	Nanomètre
V/v	Volume par volume
SE	Écart-type

CHAPITRE PREMIER

INTRODUCTION GÉNÉRALE

1.1 Introduction

La famille des loups de mer (Anarhichadidae) compte neuf espèces, dont trois sont présentes dans l'Océan atlantique nord (*Anarhichas lupus*, *Anarhichas minor*, *Anarhichas denticulatus*). On les retrouve le long des côtes de la Norvège, du Groenland, de l'Islande, des Grands Bancs de Terre-Neuve, de la Nouvelle-Écosse et du Golfe du Saint-Laurent. En dépit d'attributs commerciaux intéressants, ces espèces peuvent difficilement faire l'objet d'une pêche dirigée, étant donné leur caractère solitaire, limitant la formation de bancs. En fait, les prises rapportées sont peu importantes et résultent généralement de pêches accidentelles qui surviennent lors d'activités visant des espèces commerciales plus accessibles (morue, flétan).

L'aquaculture constitue une approche complémentaire intéressante pour pallier à ces prises incertaines, ainsi qu'à l'effondrement généralisé des stocks et la diminution des débarquements. Il s'agit actuellement du secteur de production alimentaire connaissant la plus forte croissance au monde. Étant pourvu d'abondantes ressources biophysiques favorables à cette activité, le Québec a définitivement la possibilité de prendre sa part du marché (BCDA 2003). Dans le contexte présent où l'état des pêcheries traditionnelles est fragile, notre province tirerait avantage à diversifier sa

production maricole; l'exploitation de nouvelles espèces maricoles pourrait favoriser le passage d'un approvisionnement actuellement très variable, vers un état plus stable et propice au développement d'un marché consolidé. L'industrie maricole québécoise est encore jeune — la production du Québec ne compte que pour 3% de la valeur de la production canadienne (MAPAQ 2003) — et les efforts majoritairement dirigés vers l'élevage des mollusques (principalement la moule). L'historique de l'activité d'élevage de poissons, quant à elle, se limite essentiellement à l'élevage de salmonidés en eau douce (omble de fontaine, omble chevalier, truite arc-en-ciel et saumon atlantique); près de 95 % des ventes de produits aquacoles proviennent de ces élevages (MAPAQ 2003). Une production maricole reposant sur un nombre restreint d'espèces peut représenter des risques avec l'augmentation des volumes de production : épidémies dévastatrices, concurrence et rétrécissement de la marge de bénéfice, perte d'intérêt des consommateurs. De plus, ceci réduit certaines régions à l'inaction, les espèces favorisées ne pouvant être élevées partout (conditions climatiques, hydrodynamisme local, etc.). La volonté des différents paliers de gouvernement témoigne bien de l'intérêt à développer la mariculture québécoise, par l'annonce récente de fonds consacrés à des projets de recherche et de développement de ce secteur. Ceux-ci reconnaissent qu'il peut s'agir d'un facteur déterminant pour la revitalisation économique et sociale des localités côtières et rurales, faisant face au déclin des pêcheries et à l'exode des populations (BCDA 2003, MAPAQ 2003).

L'intérêt porté au Loup de mer, en tant que sujet prometteur pour l'élevage commercial, a pris naissance au milieu des années quatre-vingt en Norvège. Pavlov et Novikov (1986) furent parmi les premiers à suggérer ce groupe de poissons comme

étant propice à l'aquaculture. Depuis, le Loup atlantique (*Anarhichas lupus*) et le Loup tacheté (*Anarhichas minor*) ont pu être identifiés en tant qu'espèces potentielles pour l'aquaculture en eau froide en Europe du Nord (Tilseth 1990, Moksness & Pavlov 1996, Falk-Petersen et al. 1999) et dans l'est du Canada (Brown et al. 1995). Récemment, un groupe de chercheurs québécois a accordé les premier et deuxième rangs — sur un total de 44 espèces étudiées — aux Loup atlantique et tacheté, en tant qu'espèces offrant un fort potentiel aquacole en contexte québécois (LeFrançois et al. 2002). En 2003, le Commissaire au Développement de l'Aquaculture canadien (BCDA 2003) nommait le loup de mer comme espèce d'intérêt pour l'émergence de nouvelles productions commerciales. Au Québec, des efforts de R&D dirigés vers l'élevage des Loup atlantique et tacheté sont en cours depuis 1999 au Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière (MAPAQ 2003) par le biais de l'entente MAPAQ-UQAR. L'équipe de recherche possède un groupe de plus de 35 géniteurs de Loup tacheté provenant du milieu naturel. L'atteinte d'un stade pré-commercial est souhaitée pour les prochaines années. La Norvège détient aujourd'hui le niveau de connaissances le plus avancé concernant la biologie de l'espèce et son élevage, qui en est maintenant à un stade pré-commercial (Tommarin A/S). Ces connaissances, via des activités de transfert technologique, pourront être fort utiles pour l'accélération de l'atteinte de la commercialisation en Amérique du Nord. C'est d'ailleurs dans cet état d'esprit qu'un atelier portant sur l'élevage du Loup de mer (Wolffish Cultivation Workshop : a productive partnership 3-4 juin 2002, Halfyard & Parrish 2002) s'est déroulé à Rimouski, lors de l'été 2002, rassemblant les principales industries et équipes de recherche concernées (Québec, Terre-Neuve et Norvège). Ce premier atelier international a notamment permis la consolidation de partenariats entre les différents

pays, afin d'éviter la dispersion des efforts de R&D et ainsi assurer l'atteinte rapide d'un niveau de production commercial.

L'intérêt pour l'élevage de ces espèces en Amérique du Nord peut d'abord s'expliquer par des caractéristiques organoleptiques enviables. La chair de ces poissons est blanche et ferme. De plus, le rendement au filet est notable, soit respectivement de 45 et 50 % pour le Loup atlantique et le Loup tacheté (Moksness 1994). Il faut en plus souligner la popularité de la peau de l'animal, particulièrement en Norvège (Falk-Petersen et al. 1999), dont le cuir sert à la fabrication de vestes, de couvertures de livres, de meubles, etc.

Le Loup de mer présente aussi des caractéristiques physiologiques rencontrant les critères recherchés par l'industrie aquacole canadienne. Tout d'abord, il est naturellement adapté à un climat nordique et donc à des eaux relativement froides, telles qu'on les retrouve au Québec. Un point fort important réside dans le fait que les juvéniles démontrent des performances de croissance remarquables en captivité. Alors que l'animal atteint une masse de 1 kg après 7 ans de vie en milieu naturel, 2 ans seulement sont suffisants en captivité (Falk-Petersen et al. 1999). À ce stade, l'animal n'est toujours pas mature, et l'essentiel de ses investissements est donc consacré à la croissance somatique. Aussi, les activités de nage étant peu fréquentes, les économies d'énergie favorisent les activités de synthèse anabolique (Moksness & Pavlov 1996). Fait important, le Loup est caractérisé par une ontogénie de type « direct » (Falk-Petersen & Hansen 2003); à l'éclosion, les larves présentent un stade de développement très avancé (environ 30 mm de longueur en moyenne), affichant déjà la morphologie de

juvénile. Contrairement à la majorité des espèces de poissons marins, le Loup de mer a la capacité de s'alimenter à partir d'aliments de formulation dès l'éclosion. L'élevage larvaire est ainsi grandement simplifié et moins coûteux si on le compare aux technologies plus complexes ayant dû être développées pour respecter les longues périodes de métamorphoses qui caractérisent la majorité des espèces marines d'intérêt maricole (ex : morue, flétan). Le Loup manifeste une bonne résistance au stress (Moksness & Pavlov 1996) et est aussi très tolérant aux densités élevées (Moksness et al. 1989, Falk-Petersen et al. 1999); ce dernier critère est particulièrement intéressant en ce qu'il peut permettre d'économiser sur les infrastructures dédiées aux élevages. La maladie est plutôt exceptionnelle et ne semble se manifester qu'à la suite d'un stress marqué (Espelid 2002). Les modalités de reproduction artificielle en captivité sont bien connues et les technologies d'élevage (incubateur et auge) sont comparables à celles mises en place pour les salmonidés (Pavlov & Moksness 1994a). À la liste des critères favorables à la culture du Loup de mer s'ajoute finalement le fait que l'on rapporte des taux de survie en captivité relativement élevés, du moins chez le Loup atlantique (Moksness & Pavlov 1996).

L'intérêt particulier porté au loup de mer n'est pas sans tenir compte des particularités déjà connues et associées à l'élevage d'autres espèces marines, plus communes, vers lesquelles des efforts de recherche importants ont déjà été dirigés pour une mise en élevage commerciale éventuelle. La Morue franche (*Gadus morhua*) et le Flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*) sont de bons exemples de ces espèces cibles. L'élevage de la morue franche implique des difficultés au niveau de la maintenance des larves. Celles-ci sont très petites à l'éclosion, soit de 3.5 à 4.5 mm de

longueur et la métamorphose survient à 13 mm, c'est-à-dire 40 à 50 jours suivant l'éclosion (Jobling & Pedersen 1995). Une fois les périodes de métamorphose et de sevrage passées, le taux de survie des larves n'est que de 5 à 20 % (Olsen, 1997). L'alimentation des larves en élevage nécessite un suivi très particulier : rotifères et micro-algues, suivit d'un ajout de nauplii d'*Artemia*, suivit d'un ajout d'*Artemia* enrichie, puis période de transition avec nourriture de sevrage et *Artemia*, pour atteindre le sevrage complet au bout de 60 jours (Olsen, 1997). Baskerville-Bridges & Kling (1996) insistaient aussi sur le fait que le taux de survie des larves dépendait d'un début de sevrage sur aliments de formulation plus tardif. Enfin, les températures de croissance optimales rapportées pour la morue franche sont relativement élevées (9-15 °C) (Jobling & Pedersen 1995) et plusieurs maladies et parasites ont été répertoriés (vibriose, nécrose érythrocytaire, exophtalmie, etc.) (Dutil et al. 1989). Pour sa part, le Flétan de l'Atlantique (*Hippoglossus hippoglossus*) fait l'objet d'essais d'élevage au Canada depuis plus de 10 ans. Les stades embryonnaire et larvaire sont encore considérés comme critiques ; des taux de survie allant de 0 à 10 % seulement sont rapportés chez les oeufs, ainsi que des variations aussi importantes que de 0 à 50 % de taux de survie précédant la première alimentation (Olsen 1997). Les larves, de petite taille à l'éclosion (6-7 mm), nécessitent au moins 50 jours de période vitelline avant de débiter leur alimentation exogène (Haug 1990), qui doit être constituée de proies vivantes, telles que rotifères, artémies et copépodes, pour assurer une certaine survie (Olsen, 1997). La survie des larves est également défavorisée à certaines gammes de salinité, qui doit se situer entre 30 et 32 ppt (Waiwood et al. 1997). Une attention et des traitements particuliers doivent donc être prodigués à ce stade fragile. Autres fait à considérer, le taux de croissance demeure optimal dans des conditions de température

relativement élevée, soit supérieure à 8 °C, sans quoi la prise de nourriture chute (Sutherland 1997). Finalement, la température s'avère également déterminante pour l'obtention de produits sexuels lors du frai ; elle doit se situer dans la gamme des 7 à 10 °C (Holmefjord & Lein 1990). Puisque les premiers stades de vie (embryonnaire et larvaire) constituent le principal obstacle à une production en élevage chez ces deux espèces marines d'intérêt, une alternative peut devenir envisageable pour ces espèces dont les prises en mer sont possibles, soit l'engraissement de juvéniles. Le François et al. (2002) classaient la Morue franche et le Flétan de l'Atlantique au 2^e et 3^e rang respectivement des espèces offrant un potentiel pour ce genre de culture en contexte québécois. Toutefois, la présence de glaces sur le fleuve durant une partie importante de l'année n'est pas sans causer de restriction importante, puisqu'elle réduit considérablement la période permettant la prise de juvéniles. Faut-il considérer aussi l'impact de ces prises et/ou rejet sur la survie des poissons. Dans cette optique, l'élevage œuf à œuf, comme proposé pour le Loup de mer, peut représenter une facilité d'opération considérable en ce que les prises en mer ne sont pas nécessaires. Bien que pertinente puisque basée sur des espèces dont l'intérêt aquacole est bien réel (Morue franche et Flétan atlantique), la comparaison des caractéristiques d'élevage de ces espèces avec celles du Loup de mer n'en est qu'une parmi d'autres, mais vise à apporter une certaine compréhension des avantages relatifs que peut représenter l'élevage de l'espèce faisant l'objet du présent ouvrage.

1.1.1 Le Loup tacheté

Bien que ce soit le Loup atlantique qui ait attiré davantage l'attention des chercheurs dans les premières années, les efforts de développement de son élevage

commercial a finalement été freiné au profit de l'un de ses confrères : le Loup tacheté. En fait, les perspectives de performances de croissance de ce dernier se sont révélées bien supérieures, soit environ le double. Alors que le Loup atlantique peut atteindre un poids d'environ 2,5 kg en deux ans, le Loup tacheté peut atteindre les 5 kg (Moksness 1994), ce qui peut contribuer à une hausse de productivité. Il faut aussi ajouter un rendement en chair supérieur de 5 % chez le Loup tacheté, comparativement au Loup Atlantique (Moksness 1994). De plus, le cuir provenant du premier est davantage apprécié, en raison de ses motifs plus attrayants. La valeur du produit final pourrait également être majorée grâce à l'extraction de biomolécules, tels les protéines antigel, les polypeptides antimicrobiens et les enzymes digestives, produits recherchés dans divers domaines en développement tels les industries pharmaceutique, cosmétique et nutraceutique (Le François et al. 2004). Les avantages offerts par le Loup tacheté au chapitre de ses exigences thermiques se révèlent être très intéressants pour la consolidation de la compétitivité du Québec, puisqu'une croissance optimale des juvéniles nécessite des températures un peu plus froides pour celui-ci (Falk-Petersen et al. 1999) que pour le Loup atlantique (McCarthy et al. 1998). Évidemment, le peu de connaissances acquises spécifiquement sur le Loup tacheté pourrait constituer un obstacle à une mise en marché rapide, mais l'expérience de la Norvège est prometteuse. Les avancées technologiques existantes pour le Loup atlantique ont pu être transférées au Loup tacheté, de sorte que la production en est déjà à un stade pré-commercial. Pour toutes ces raisons, l'espèce est aujourd'hui perçue comme étant une meilleure candidate pour l'élevage au Québec et la réalisation de divers projets de recherche, visant la compréhension de la biologie de l'espèce, est souhaitée pour les années à venir.

1.2 Problématique

La mise sur pied d'un élevage piscicole rentable et durable nécessite l'assurance que les conditions optimales sont réunies pour l'atteinte du but ultime : produire des individus de qualité et ce, tout le long du cycle de vie. La qualité d'un individu, dans un contexte de commercialisation, s'exprime par son potentiel de survie et de croissance. Un stock de poissons présentant des mortalités minimales et des taux de croissance intéressants s'avère évidemment plus profitable. Alors que les taux de croissance sont effectivement satisfaisants chez le Loup tacheté, les taux de survie rapportés aujourd'hui en élevage ne sont pas pleinement satisfaisants, les stades embryonnaire et larvaire étant les stades critiques. En fait, bien que près de 100 % des juvéniles et adultes puissent survivre aux conditions en élevage, les taux de survie rapportés durant la période d'incubation et au moment de la première alimentation varient largement, soit de 0 à 78 % et de 18 à 50 %, respectivement (Falk-Petersen et al. 1999). Bien que le Loup tacheté puisse certainement profiter des connaissances déjà acquises sur le Loup atlantique pour combler quelques lacunes, certains points doivent tout de même être approfondis. Une compréhension solide de la biologie et de la physiologie reproductive (éléments ayant un impact sur la qualité des jeunes individus) est essentielle pour apprendre à maîtriser adéquatement la gestion de la reproduction. L'optimisation de la qualité des jeunes stades est l'un des principaux objectifs qu'il faudra atteindre pour s'assurer d'un bon rendement. Dans cette optique, la présente étude s'intéressera plus particulièrement au stade embryonnaire.

1.2.1 Études antérieures des caractéristiques fondamentales embryonnaires

L'optimisation de la qualité des individus d'élevage doit passer par une amélioration des connaissances de la biologie fondamentale de l'animal. Le stade embryonnaire chez les poissons fait l'objet d'études depuis quelques décennies. Les premières expériences ont porté principalement sur l'effet de facteurs externes (environnementaux) sur la viabilité de l'œuf : méthodes de reproduction (Pavlov & Novikov 1986, Pavlov 1994, Pavlov & Moksness 1996a), période de maturation ovarienne (Craig & Harvey 1984), températures d'élevage (Pavlov & Novikov 1986, Tveiten & Johnsen 1999, Ouellet et al. 2001, Tveiten et al. 2001), etc. Pour sa part, l'étude des paramètres physiologiques associés à cette viabilité a débuté plus récemment. Le métabolisme énergétique exprimé par la consommation d'oxygène a fait l'objet de plusieurs études (Boulekbache 1981, Rønnestad et al. 1992, Finn et al. 1995d, Sivaloganathan et al. 1998). La majorité des études s'est toutefois intéressée à la composition biochimique de l'œuf — contenus et séquences temporelles d'utilisation des substrats énergétiques et autres constituants : glucides, lipides, acides aminés, vitamines, métaux, hormones (Rønnestad et al. 1994, Finn et al. 1995b, Parra et al. 1999, Wendling et al. 2000, Lahnsteiner et al. 2001) — plusieurs ayant pour objectif d'identifier des indicateurs de qualité de celui-ci (Kjørsvik 1994, Shields et al. 1997, Lahnsteiner et al. 1999, Halfyard et al. 2000). Certaines études ont effectivement permis de mettre en relation certains de ces paramètres intrinsèques à l'œuf avec ses chances de survie, mais ces relations semblent être loin de s'appliquer à l'ensemble des espèces étudiées.

Bien que des efforts considérables aient été réalisés pour éclaircir les mécanismes physiologiques aux stades embryonnaires, certains *paramètres biochimiques* demeurent encore peu exploités ; l'investigation de ceux-ci pourrait permettre, en premier lieux, d'accroître les connaissances relatives à l'embryogenèse et éventuellement, aux éléments déterminant la viabilité de l'œuf. L'activité des *voies cataboliques* et du *métabolisme énergétique*, ainsi que leurs rôles quant à la survie de l'œuf, constituent un aspect non négligeable du développement embryonnaire. Les dernières études, qui portent essentiellement sur les contenus énergétiques au stade embryonnaire (Evans et al. 1998, Matschak et al. 1998, Lahnsteiner et al. 1999, Lahnsteiner et al. 2001), suggèrent fortement de s'investir dans l'embryogénèse du métabolisme. Toutefois, l'élément « activité métabolique » ayant été peu exploré, une seule étude — à ma connaissance — a considéré l'ensemble des principales voies métaboliques simultanément (Lahnsteiner & Patarnello 2003). Cette approche pourrait permettre de répondre éventuellement à des questions n'ayant jamais été abordées : 1. Quel(s) type(s) de voie(s) métabolique(s) est/sont privilégié(s) durant l'embryogénèse (ex : capacité aérobie vs capacité anaérobie) ? ; 2. Comment évoluent temporellement ces voies métaboliques les unes par rapport aux autres ? ; 3. Existe-t-il des ratios particulièrement avantageux pour le développement ? ; 4. Le métabolisme énergétique et les capacités digestives agissent-ils en synergie ? ; 5. Un défaut métabolique au début du développement peut-il être réajusté plus tard ? ; 6. Existe-t-il un lien entre les caractéristiques métaboliques embryonnaires et les performances larvaires ? ; etc. Finalement, les analyses de la majorité des études impliquant des voies métaboliques ont été réalisées de façon ponctuelle dans le temps, c'est-à-dire à un *moment spécifique* du développement embryonnaire (à la fertilisation, au stade oeillé, avant l'éclosion...).

Chercher à avoir une vue d'ensemble du suivi temporel d'un nombre important de voies métaboliques clefs chez l'embryon constitue une approche nouvelle. Les informations disponibles sur le Loup tacheté quant aux caractéristiques biochimiques du stade embryonnaire et aux facteurs pouvant en affecter la survie sont plutôt restreintes et concernent principalement les températures d'incubation (Pavlov & Moksness 1994b, Pavlov & Moksness 1996b, Pavlov & Moksness 1997) et de conditionnement de géniteurs (Tveiten et al. 2001). Concernant plus spécifiquement le Loup atlantique *Anarhichas lupus*, Halfyard et al. (2000) ont pu mettre en relation les taux d'éclosion et de survie à des teneurs en acides eicosapentanoïque (EPA) et docosahexanoïque (DHA).

1.2.2 Un outil éventuel : les indicateurs de qualité

La liste des facteurs potentiels suggérés dans la littérature et pouvant influencer la qualité des œufs est relativement longue : conditions parentales (génétique : qualité de l'ovocyte et du sperme, diète), méthodes de reproduction (naturelle ou assistée, stimulation de la ponte, sur maturation des œufs, méthodes de ponte), conditions de culture des géniteurs et des œufs (stress, température, oxygénation, colonisation microbienne ...) (Bromage & Roberts 1995). Toutefois, particulièrement chez les poissons marins, les liens entre ces facteurs et la qualité embryonnaire ont rarement été démontrés de façon claire. Pour déterminer l'impact de ces facteurs sur la qualité de ce stade et apprendre à les contrôler, il faut pouvoir identifier des critères de qualité fiables. Certains indicateurs de qualité ont déjà été identifiés et employés. Kjørsvik et al. (1990) en font une revue relativement complète et encore d'actualité : taux de fertilisation ; propriétés physiques et physiologiques (forme de l'œuf, flottabilité, osmolarité du vitellus, etc.) ; morphologie (distribution des gouttelettes lipidiques,

observation des 1^{ères} divisions des blastomères, etc.); taille de l'œuf; contenu biochimique (protéines, lipides, acides aminés, pigments, etc.) et distribution des chromosomes. Finalement, une tendance à identifier des indicateurs métaboliques s'affirme depuis quelques années (Lahnsteiner et al. 1999, Lahnsteiner et al. 2001, Lahnsteiner & Patarnello 2003).

Un bon indicateur de qualité se définit comme étant simple à utiliser et doit surtout pouvoir servir le plus tôt possible au cours du développement (Bromage & Roberts 1995). La perspective offerte par un tel outil est fort intéressante : permettre de déterminer, le plus tôt possible au cours du cycle de vie, la qualité d'un individu, c'est à dire ses potentiels de survie et de croissance futurs. Pour l'éleveur, ceci signifie une simplification et une plus grande efficacité de la gestion des stocks ; une sélection d'individus pourrait être réalisée dès le stade embryonnaire puis l'investissement dirigé strictement vers les sujets les plus prometteurs. Au niveau de la recherche, il ne pourrait qu'être avantageux de pouvoir statuer rapidement sur l'effet des nombreux facteurs déterminant la condition des œufs et par le fait même le rendement des élevages. Une attente de quelques mois d'incubation et de vie larvaire, pour enfin pouvoir évaluer l'effet d'un facteur antécédent particulier sur le taux de survie et de croissance de la larve, représente en effet un ralentissement notable pour l'avancement des connaissances. Enfin, d'un point de vue écologique, le développement d'un outil puissant pour comprendre l'impact de facteurs biotiques et abiotiques sur le recrutement en milieu naturel pourrait aussi être fort utile, particulièrement à une époque où la difficulté de régénération de plusieurs populations sauvages est bien connue. Aucun indicateur de qualité ne semble avoir été développé spécifiquement pour une utilisation

de routine chez le Loup tacheté ; les auteurs se basent généralement sur le taux de fertilisation, ainsi que les taux de survie à l'éclosion ou au stade larvaire, pour évaluer l'effet des facteurs concernés. Chez le Loup atlantique *Anarhichas lupus*, le taux d'éclosion a déjà été corrélé au taux de division normal des blastomères (Pavlov & Moksness 1994).

Des procédures rapides sont aujourd'hui privilégiées et utilisées de façon routinière dans les écloseries pour évaluer les chances de développement normal des œufs. Globalement, ces procédures impliquent l'utilisation de critères plutôt morphologiques ; les taux de fertilisation et de développement normal des blastomères constituent les observations les plus prisées. Chez les salmonidés, le taux de fertilisation s'est avéré être un bon prédicateur de la viabilité de l'œuf (Bromage & Roberts 1995), cette relation ne semblant toutefois pas applicable aux espèces de poissons marins. En fait, il ressort que le taux de succès à l'éclosion est davantage corrélé au taux normal de division des blastomères (déroulement du développement cellulaire précoce) qu'au taux de fertilisation chez les espèces marines étudiées, tels que la Morue de l'Atlantique *Gadus morhua* L. (Kjørsvik & Lønning 1983, Kjørsvik et al. 1984) et le Flétan *Hippoglossus hippoglossus* (Shields et al. 1997). Toutefois, une étude récente (Kjørsvik et al. 2003) dévoilait que non seulement le taux de blastomères normaux, mais également le taux de fertilisation, pouvait témoigner de la qualité de l'œuf du turbot *Scophthalmus maximus* L., une espèce marine.

Cette non récurrence, d'une espèce à l'autre, de l'efficacité d'utilisation de ces indicateurs de qualité, permet difficilement de s'en remettre exclusivement à ceux-ci

pour évaluer la qualité des œufs dans un contexte d'élevage. En ce qui concerne l'étude de la morphologie des blastomères, la procédure expérimentale peut être laborieuse si des analyses de routine sont envisagées. Elle s'avère de plus subjective; l'attribution de pointage qualitatif (très anormal *1 point* à normal *4 point*) à un certain nombre de paramètres (symétrie bilatérale des axes de division, taille des cellules, adhésion des cellules entre-elles, discrimination des membranes cellulaires et présence de vacuoles s'insérant entre les cellules) se doit préférentiellement d'être effectuée par un seul observateur pour plus de rigueur (méthode de Shields et al. 1997). Aussi, malgré la simplicité d'analyse de certains critères morphologiques tels les taux de fertilisation et d'éclosion, ceux-ci n'apportent que peu d'éclaircissement sur les causes biologiques (antécédents familiaux) d'une qualité médiocre d'œuf, ou sur la nature de l'influence de divers facteurs environnementaux (température, alimentation, etc.) sur l'œuf lors de la maturation ovarienne de la femelle. S'il peut être intéressant de statuer sur la qualité de l'œuf, l'intérêt est encore plus grand de pouvoir se prononcer sur les paramètres responsables de cette qualité.

Outre les critères morphologiques, d'autres variables, plus intrinsèques à l'œuf, ont bien été mises en valeur pour prédire le potentiel de survie des œufs fertilisés, mais celles-ci demeurent encore plus spécifiques aux espèces en question. Beaucoup d'investigations biochimiques ont récemment été menées sur la composition de l'œuf, des ressources biochimiques durant l'embryogenèse, ainsi que sur les différences biochimiques entre les œufs viables et non viables. Par exemple, Lahnsteiner & Patarnello (2003) ont put établir un lien entre la non viabilité des œufs de la Dorade royale *Sparus aurata* et l'altération de sa composition biochimique (niveau relativement

bas en ATP, acétyl-Co A, phospholipides, glucose, fructose, galactose, acides aminés, phosphate inorganique et de la charge énergétique adénylate ; niveau élevé en ions magnésium et calcium), de même que la diminution relative de l'activité de plusieurs enzymes (malate déshydrogénase, pyruvate carboxylase, transaldolase, glutamate déshydrogénase). Pour la même espèce, des capacités supérieures de transcription et de synthèse protéique, exprimées en terme de ratios ARN/ADN et ARN/contenu en protéines, ont aussi été reliées à une meilleure viabilité de l'œuf (Carnevali et al. 2001). Chez le bar de mer *Lates calcarifer* Bloch, quelques composantes de l'œuf sont suggérées pour l'évaluation de sa qualité (Nocillado et al. 2000); les teneur en acides gras saturés et en phosphosérine ont été corrélées positivement au taux de fertilisation, le contenu en acide aspartique au taux d'éclosion et les teneurs en acides gras saturés ainsi qu'en acide docosahexanoïque au pourcentage de zygotes à développement normal. Enfin, comme dernier exemple d'investigations sur les indicateurs de qualité des œufs, une nouvelle approche a été utilisée par Rime et al. (2004) et consiste en des analyses protéomiques du liquide ovarien de la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*. Leurs observations suggèrent que certains fragments protéiques de l'oocyte s'accumuleraient dans le liquide ovarien qui les baigne durant la période post-ovulatoire et pourraient être utilisés pour détecter la dégradation de la qualité de ces oocytes, associée à une période post-ovulatoire trop longue avant la fertilisation.

L'analyse du contenu en certains constituants biochimiques peut nécessiter l'utilisation d'appareillages spécifiques, particulièrement coûteux et pouvant ainsi être difficilement accessible pour un producteur en éclosion. En effet, alors que Rønnestad et al. (1998) démontraient une diminution clairement significative du contenu en acides

aminés durant le développement de l'œuf de la dorade royale *Sparus aurata*, Lahnsteiner & Patarnello (2003) n'ont pu détecter la même tendance. Leur explication tenait dans la comparaison du pouvoir de résolution de la méthode expérimentale utilisée. Une simple technique de coloration (réactif de phénol Folin-Ciocalteu) n'avait pu être efficace pour détecter l'évolution temporelle du contenu; un analyseur en acides aminés automatique muni d'un détecteur fluorométrique et d'un applicateur à haute pression semblait davantage recommandé. La caractérisation du contenu en acides gras est un autre exemple de la barrière que constitue l'équipement nécessaire pour de telles analyses. Dans ce cas, chromatographes en phase gazeuse, équipés de détecteurs et d'intégrateurs spécifiques sont souvent indispensables, sans compter les étapes précédentes d'extraction qui allongent la durée des analyses.

Une étude préliminaire (Lamarre et al. 2004) suggère qu'il pourrait exister un lien entre les capacités métaboliques embryonnaires et la qualité des larves de Loup de mer (*Anarhichas lupus*), en terme de taux de survie et de croissance. Il semble que les patrons de certaines voies cataboliques et énergétiques chez l'œuf à l'éclosion, soit la dégradation des protéines, l'oxydation des acides aminés, la glycolyse aérobie, ainsi que la glycolyse anaérobie, puissent témoigner des capacités futures (survie et croissance) des individus post-éclosion. Ces données soulèvent la perspective que ces caractéristiques cataboliques et énergétiques puissent être relevées plus tôt, soit durant le développement de l'œuf, et reliées à la qualité des individus des stades de développement suivants (larves, juvéniles, adultes). La caractérisation des capacités métaboliques par des techniques enzymologiques devrait être relativement accessible en

milieu d'élevage, ces techniques nécessitant un appareillage plus général et commun que la majorité des techniques biochimiques suggérées jusqu'à ce jour.

1.3 Objectifs

Comprendre comment produire des œufs de qualité optimale demeure évidemment un objectif à long terme. Avant de contrôler les facteurs pouvant déterminer la qualité des œufs, la compréhension des phénomènes physiologiques et métaboliques fondamentaux qui gouvernent l'embryogenèse constitue certainement un point essentiel. Dans cet ordre d'idée, le **premier objectif** de l'étude consiste à *caractériser l'ontogénie des capacités cataboliques et du métabolisme énergétique chez l'embryon en développement, durant la seconde moitié du développement*. Ceci devrait permettre de dresser un patron de l'évolution des capacités de dégradation des protéines et des triglycérides, ainsi que de l'activité de certaines voies métaboliques clefs au cours du développement de l'œuf du Loup tacheté.

Le **second objectif** consiste à *vérifier la relation entre les capacités cataboliques ainsi que du métabolisme énergétique de l'œuf et le taux de survie au stade oeillé*. Ceci devrait permettre d'évaluer s'il est possible de statuer sur la qualité de l'œuf de loup tacheté à partir de ses caractéristiques de dégradation et de production énergétique. Cet objectif amène une perspective de second plan intéressante ; dans le cas où des relations entre la qualité des œufs et les patrons des enzymes métaboliques seraient dévoilés, il deviendrait possible d'*identifier des indicateurs de qualité de l'œuf (sous-objectif)*. On peut également présumer que les paramètres métaboliques liés à la performance des œufs devraient varier d'une famille à l'autre.

L'étude comporte donc un premier volet d'intérêt strictement fondamental, soit l'embryogenèse des capacités cataboliques et énergétiques. Un second volet d'ordre plus pratique vient ensuite s'ajouter, visant l'identification d'indicateurs de qualité de l'œuf.

1.4 Méthodologie

1.4.1 Approche expérimentale

Les œufs de Loup tacheté provenaient de la ferme d'élevage Troms Steinbit AS (Tromsø, Norvège). Une fois expulsés de la cavité abdominale de la femelle, les œufs ont été fertilisés, incubés à température contrôlée et certains prélevés des incubateurs durant leur développement à chacun des stades suivants, arbitrairement définis : 350 (stade oeuillé, stade 4), 540 (stade 5), 720 (stade 6) et 900 (pré-éclosion, stade 7) degré jour suivant la fertilisation. Provenant d'une possibilité de seize croisements parentaux différents, 10 œufs appartenant à neuf, dix, dix et huit de ces différents croisements furent prélevés aux stades 4, 5, 6 et 7 respectivement. Les œufs provenant de trois des croisements furent prélevés à chacun des stades de développement. Les taux de survie au stade oeuillé propres à chacun des 16 différents croisements variaient graduellement entre 2 et 95 %.

La présence et l'évolution ontogénique de différentes voies cataboliques et du métabolisme énergétique ont été vérifiées par mesure d'activités enzymatiques sur les œufs individuels. Ces analyses ont été réalisées, à température contrôlée (15 °C), par spectrofluorométrie pour ce qui est des protéases trypsiques et de la triglycéride lipase, et par spectrophotométrie dans le cas de la pyruvate kinase, l'aspartate

aminotransférase, la glutamate déshydrogénase, l'hydroxyAcyl-CoA déshydrogénase, la citrate synthase, ainsi que la lactate déshydrogénase.

Des analyses statistiques ont été menées dans le but de caractériser le développement des capacités métaboliques de l'œuf, par comparaison des activités enzymatiques et de certains ratios d'activités en fonction des stades de développement (ANOVAs). Des ANOVAs dans lesquels le «stade de développement» a été niché dans le «croisement parental» ont permis de vérifier l'effet de la famille (croisement parental) sur les activités enzymatiques. Un test de comparaisons multiples de Tukey a été utilisé lorsque des différences significatives étaient observées. Les coefficients de variation des activités enzymatiques ainsi que des ratios d'activité à l'intérieur des familles et entre les familles ont été calculés. Pour chaque enzyme, l'évolution de l'activité en fonction du taux de survie au stade œillé a également été vérifiée par régression linéaire.

Note : Pour plus de détails sur la méthodologie, veuillez vous référer à l'article « Ontogenesis of catabolic and energy metabolism capacities during the embryonic development of Spotted wolffish (*Anarhichas minor*) » au chapitre second.

1.4.2 Rôle fonctionnel des enzymes étudiées

Enzymes cataboliques

La trypsine (TRY) est l'enzyme la plus impliquée dans la digestion des protéines chez les poissons (Ueberschar 1988). Sécrétée par le pancréas, cette endopeptidase à sérine (Tietz 1986) est libérée dans le tube digestif, où elle hydrolyse les liens formés

entre les groupes carboxyles de la lysine et l'arginine avec d'autres acides aminés (Dixon et al. 1979). La réduction des chaînes polypeptidiques en segments plus courts permet l'assimilation des protéines par le tube digestif.

Des lipases digestives (LIP) sont également présentes dans le tractus digestif des poissons (Lie et al. 1987, Borlongan 1990, Koven et al. 1994). Les lipases hydrolysent les liaisons esters des triglycérides, permettant la libération de molécules d'acides gras et de glycérol (Tietz 1986), pouvant ainsi être absorbées par l'intestin.

Enzymes du métabolisme énergétique

Les enzymes énumérées dans cette section, de même que les réactions qu'elles catalysent, ont fait l'objet de nombreuses études et sont aujourd'hui considérées comme des « enzymes clefs » des voies métaboliques où elles sont chacune impliquées.

La pyruvate kinase (PK) catalyse une des réactions de la dernière étape de la glycolyse. Elle assure le transfert du groupement phosphate du phosphoénolpyruvate à l'adénosine diphosphate (Lehninger et al. 1993). La glycolyse est la voie de dégradation du glucose, celle par laquelle s'écoule le plus grand flux de carbone dans la plupart des cellules. L'activité de la PK indique la capacité à utiliser les glucides comme carburant énergétique.

L'aspartate aminotransférase (AAT) et la glutamate déshydrogénase (GDH) sont impliquées dans les réactions de transamination des acides aminés. La première

réaction catalyse la transamination de l'aspartate. Elle produit de l'oxaloacétate et du glutamate, qui est ensuite converti en α -cétoglutarate par la GDH. Cette dernière réaction est responsable de l'intégration des acides aminés dans le cycle de l'acide citrique (Lehninger et al. 1993). Les activités de l'AAT et de la GDH indiquent la capacité à oxyder les acides aminés pour la production d'énergie, ou encore la mobilisation des acides aminés pour la synthèse protéique (réaction inverse).

La β -hydroxyAcyl-CoA déshydrogénase (HOAD) est active dans la troisième des quatre étapes du cycle d'oxydation des acides gras (Lehninger et al. 1993). Son activité représente la capacité à utiliser ce carburant comme source d'énergie.

La citrate synthase catalyse la première réaction du cycle de l'acide citrique. Elle a pour rôle de condenser l'acétyl-CoA avec de l'oxaloacétate pour former du citrate (Lehninger et al. 1993). L'activité de la CS est un bon indicateur du contenu en mitochondries de la cellule et permet d'évaluer la capacité à produire de l'énergie par mode aérobie.

La lactate déshydrogénase (LDH) est une hydrogène transférase qui permet la réduction du pyruvate en lactate (Tietz 1986). Son activité est un bon indicateur de la capacité de production d'énergie en mode anaérobie.

CHAPITRE SECOND

ARTICLE SCIENTIFIQUE

**ONTOGENESIS OF CATABOLIC
AND ENERGY METABOLISM CAPACITIES
DURING THE EMBRYONIC DEVELOPMENT OF
SPOTTED WOLFFISH (*ANARHICHAS MINOR*)**

DESROSIERS, V.¹, N. R. LE FRANÇOIS^{1,2}, H. TVEITEN³ & P. U. BLIER^{1*}

¹Laboratoire de biologie évolutive, Université du Québec à Rimouski,
300 Allée des Ursulines,
Rimouski, Québec, G5L 3A1, Canada

²Centre Aquacole Marin de Grande-Rivière, Ministère de l'Agriculture, des
Pêcheries et de l'Alimentation du Québec, 6 Rue du Parc, Grande-Rivière,
Québec, G0C 1V0, Canada

³Norwegian College of Fishery Science, University of Tromsø,
N-9037 Tromsø, Norway

*Correspondence should be addressed to P. U. Blier, at the above address ;

Fax : (418) 724-1849

Email : pierre_blier@uqar.qc.ca

2.1 Abstract

The ontogenetic pattern of catabolic and energy metabolism capacities in the egg of a marine fish, the Spotted wolffish (*Anarhichas minor*), was investigated. At regular intervals, from eyed stage (350 degree days of incubation, stage 4) to pre-hatching (900 degree days, stage 7), individual eggs coming from sixteen different parental crossing were measured for their enzymatic activities, suspecting range of egg qualities. In addition to trypsin-like proteases and lipase activities (catabolic ability), metabolic capacities were assessed by following five metabolic pathways : ability to use carbohydrates (pyruvate kinase), amino acids (aspartate aminotransferase) and fatty acids (hydroxyAcyl-CoA dehydrogenase) for energy production, as well as aerobic (citrate synthase) and anaerobic (lactate dehydrogenase) modes of energy production. Functional enzymatic systems for proteins and lipids degradation, glycolysis, amino acids and fatty acids metabolism, tricarboxylic acid cycle and anaerobic glycolysis, were detected from the middle of development. A gradual significant increase of activity levels for all pathways studied was observed through development. Ratios were calculated to compare the evolution of the aerobic to anaerobic energy production and the evolution of the mobilisation of the different energy substrates. Anaerobic capacity appeared to rise significantly faster than the aerobic capacity (ratio LDH/CS: 4.23 ± 1.41 at stage 5 to 8.23 ± 3.57 at stage 7) and seemed to increasingly mobilize carbohydrates with development (ratio LDH/PK: 0.86 ± 0.30 at stage 5 to 3.57 ± 1.43 at stage 7). Ratios on the relative capacity to use specific energy substrates (carbohydrates, amino acids and fatty acids) for energy production revealed a significant slower increase in the capacity to use carbohydrates than the ability to mobilise amino acids (PK/AAT: 5.05 ± 2.45 at stage 4 to 1.25 ± 0.41 at stage 7) and

fatty acids (PK/HOAD: 7.85 ± 3.50 at stage 5 to 4.12 ± 1.26 at stage 7). The relative use of carbohydrates for aerobic energy production (ratio PK/CS) appeared to decrease significantly at the end of development (5.09 ± 1.79 at stage 6 to 2.50 ± 0.86 at stage 7) and to be compensated by an increasing capacity to catabolise amino acids (ratio AAT/CS: 1.33 ± 0.52 at stage 5 to 1.96 ± 0.99 at stage 6). Significant inter familial variations were observed for all metabolic pathways. Also, the higher variability (CV) of activities observed between than within crossings for CS, LDH, AAT and PK particularly, suggests a possible parental effect on the energy metabolism of the egg. Between metabolic parameters and survival at eyed stage (varying from 2 to 95 %), slight linear relations could be established in the case of AAT and CS at stage 4 ($r^2_{\text{AAT}}=0.264$ positive relation, $r^2_{\text{CS}}=0.093$ negative relation), HOAD at stage 5 ($r^2_{\text{HOAD}}=0.091$ neg. rel.), TRY at stage 7 ($r^2_{\text{TRY}}=0.133$ neg. rel.) and LDH at stages 6 and 7 ($r^2=0.153$ pos. rel., $r^2=0.195$ neg. rel., respectively). These results suggest the possibility to use activities of the studied enzymes as egg quality indicators in wolfish.

2.2 Introduction

The fish farming industry is the food production sector currently showing the fastest growth rate in the world. This competitive industry is still developing means to improve production rate and quality. High mortality rate can be a limiting factor for mass production of juvenile in several marine species like Atlantic cod *Gadus morhua* (Kjørsvik, 1994), turbot *Scophthalmus maximus* (McEvoy 1984, Fauvel et al. 1992) and halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Bromage et al. 1994, Kjørsvik & Holmefjord 1995). In marine fish, the critical stage in the success of a particular year-class to reach on-growing stage is the larval stage, particularly the first feeding period (Tilseth 1990). Previous studies have shown that larval performance is highly dependent on the quality of the egg (Kjørsvik et al. 2003, Lamarre et al. 2004). The study of egg quality has received great attention, principally since the survival rate during embryonic stage display high variability, loosely or not at all linked to expected factors (Kjørsvik 1994, Pavlov & Moksness 1994a, Shields et al. 1997, Halfyard et al. 2000, Neidig et al. 2000, Wendling et al. 2000, Tveiten et al. 2001, Lahnsteiner & Patzner 2002).

Knowledge of intrinsic egg parameters and identification of the additional components responsible for egg viability, could help to control the proper external factors. Recent studies have focused on the biochemical parameters of the egg, particularly on the biochemical composition. For example, yolk composition and some enzyme activities have been correlated with egg viability in lake trout *Salmo trutta lacustris* (Lahnsteiner et al. 1999), gilthead sea bream *Sparus aurata* (Carnevali et al. 2001), sea bass *Lates calcarifer* (Nocillado et al. 2000) and cyprinids like common carp *Cyprinus carpio*, silvercarp *Hypophthalmichthys molitrix* and grass carp

Ctenopharyngodon idella (Lahnsteiner et al. 2001). Although considerable attempts have been made, the metabolic development of egg remain to be characterized. The early developmental stages of fish are characterized by high growth rates which, as an energetically demanding process (Blier et al. 1997), implies reliance on enzymatic systems for metabolic processes and digestive functions. In the wolffish (*Anarhichas lupus*), it has been reported that larval performance is related to metabolic and digestive capacities (Lamarre et al. 2004). Considering that metabolic pathways development begins during embryonic stage, it is suggested that egg quality could be linked to these characteristics and used to predict survival and growth performances.

The Spotted wolffish (*Anarhichas minor*) is a promising species for cold-water aquaculture (Le François et al. 2002) and has reach pre commercial stages in Norway and Eastern Canada (Québec and Newfoundland). Spotted wolffish larvae are well-developed at hatching (Falk-Petersen & Hansen 2001), immediately begin exogenous feeding, and show remarkable juvenile growth rates at low temperature in captivity (Falk-Petersen et al. 1999). Egg survival is however yet currently very variable (Falk-Petersen et al. 1999). Spotted wolffish are an interesting model, because of their relative large size compared to other marine species, allowing multiple physiological measurements and analysis on a single egg.

The aim of this study was to characterize the development of the energy metabolism and catabolic capacities of the developing spotted wolffish egg. The following enzymatic capacities were investigated : 1) carbohydrates (pyruvate kinase), amino acids (aspartate aminotransferase and glutamate dehydrogenase) and fatty acids

(hydroxyAcyl-CoA dehydrogenase) utilisation for energy production, 2) aerobic (citrate synthase) and anaerobic (lactate dehydrogenase) modes of energy production, and 3) degradation capacities of proteins (trypsin-like proteases) and lipids (triglycerid lipase). Various ratios of enzyme activity were calculated in order to 1) compare the evolution of the anaerobic to aerobic energy production pathways and to 2) compare the evolution of the mobilisation of the different energy substrates, during development. An assessment of the relation between enzymatic parameters and survival of the eggs was realized.

2.3 Materials and Methods

Eggs

Spotted wolffish eggs were obtained from a captive broodstock reared at the Troms Steinbit AS fish farm (Tromsø, Norway). Eggs were hand stripped from sixteen 6 - 7 year old females, fertilised and incubated at temperatures of between 4.6 to 7.9 °C. During embryonic development, egg samples (n = 10) from different crossings were taken from the incubation units approximately at 350 (eyed stage, stage 4), 540 (stage 5), 720 (stage 6) and 900 (pre-hatching, stage 7) degree days after fertilisation (arbitrary stages). Eggs from nine, ten, ten and eight different crossings were taken at the stages 4, 5, 6 and 7, respectively. For three of the crossings, eggs were taken at each of the four stages. They were quickly frozen at -80 °C until enzyme activities were analysed. Survival at eyed-stage for the sixteen different crossings varied gradually between 2 and 95 %.

Tissue extraction

Eggs were shipped on dry ice to the UQAR (Québec, Canada) for enzymatic analysis. Activities were determined on individual eggs. Whole individual eggs were weighed (wet) and homogenized using a Polytron Tissue Tearor (Biospec Products inc., 5000-30 000 rpm), during three 10 s periods at maximal power, in 9 volumes of Tris-HCl buffer 100 mM (pH 7.5). Samples were kept on ice during periods of 1 min between homogenization. Crude homogenates were centrifuged in a Micromax RF 120 Thermo IEC for the analysis of trypsin-like proteases (13 000 g, 15 min), lipase (3500 g, 10 min) and aspartate aminotransferase (400 g, 5 min), 4°C ; the supernatant was then collected for analysis. Crude homogenates were used for the other enzyme analysis. A portion of the homogenate (total dilution 1/100) was refrozen at -80°C for subsequent protein determination on whole individual eggs (Smith et al. 1985).

Enzyme activity measurements

Enzymatic assays were conducted in two sets for practical reasons ; a first set of eggs (n=5 from each parental crossing per stage) was used for trypsin-like proteases, pyruvate kinase, aspartate aminotransferase and glutamate dehydrogenase, and a second set (n=5 from each parental crossing per stage) for lipase, hydroxyAcyl-CoA dehydrogenase, citrate synthase and lactate dehydrogenase. Trypsin-like proteases and lipase activities were measured using an F-2500 spectrofluorimeter (Hitachi), whilst a Lambda 11 UV/VIS spectrophotometer (Perkin Helmer) was used for all other enzyme analysis. Both spectrophotometer were equipped with a thermostated cell holder. The temperature of the cell holder was controlled with a VWR Scientific 1186 circulating refrigerating water bath (VWR Company), set at 15 °C. All assays were performed in

duplicate and activity results were expressed in U g^{-1} egg and in U g^{-1} protein, where U (units) are expressed in μmol substrate transformed per minute. The assay conditions were as follows :

Trypsine-like proteases, TRY (EC 3.4.21.4): 100 mM Tris-HCl, 0.2 mM N- α -benzoyl-L-arginin-methyl-coumarinylamide (first dissolved in dimethyl sulfoxide, 0.5 % final), pH 8.0. The variation in fluorescence (excitation 380 nm, emission 440 nm) was recorded every 20 sec for 6 minutes. A standard curve of the hydrolytic product (7-amino-4-methylcoumarin) was also determined (Ueberschar 1988, Ueberschar & Clemmesen 1992). Quartz cells were used.

Pyruvate kinase, PK (EC 2.7.1.40) : 50 mM imidazole-HCl, 10 mM MgCl_2 , 100 mM KCl, 5 mM ADP, 0.15 mM NADH, 5 mM phosphoenolpyruvate, 0.6 U ml^{-1} lactate dehydrogenase, pH 7.4 (Pelletier et al. 1994). Extinction coefficient of NADH at 340 nm : $6.22 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Aspartate aminotransferase, AAT (EC 2.6.1.1) : 50 mM potassium-phosphate, 0.025 mM pyridoxal phosphate, 0.32 mM NADH, 10 mM α -ketoglutarate, 22 mM aspartate, 0.6 U ml^{-1} malate dehydrogenase, pH 7.4 (Pelletier et al. 1994). Extinction coefficient of NADH at 340 nm : $6.22 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Glutamate dehydrogenase, GDH (EC 1.4.1.2): 100 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM ADP, 250 mM ammonium acetate, 0.1 mM NADH, 14 mM α -ketoglutarate, pH 8.5 (Pelletier et al. 1994).

Lipase, LIP (EC 3.1.1.3): liposomal dispersion substrate was prepared by dissolving 2 mM 4-methylumbelliferol (4MUH) and 2 mM soybean lecithin in chloroform/methanol (2:1, v/v), followed by evaporation under a fume hood. This substrate was dissolved in 150 mM NaCl by sonication in three bursts of 1 min, 45 and 35 sec. Each reaction mixture contained 3 ml of 1 mM Tris-HCl (pH 7.5), 20 μ l of diluted homogenate and 20 μ l of the liposomal substrate. The variation in fluorescence (excitation 365 nm, emission 450 nm) was recorded every 20 sec for 6 minutes. A standard curve of the hydrolytic product (4-methylumbelliferone, 4MU) was also determined (Roberts 1985, Izquierdo & Henderson 1998). Quartz cells were used.

HydroxyAcyl-CoA dehydrogenase, HOAD (EC 1.1.1.35) : 100 mM triethanolamine-HCl, 5 mM EDTA, 1 mM KCN, 0.115 mM NADH, 0.05 mM acetoacetyl CoA, pH 7.0 (Thibeault et al. 1997). Extinction coefficient of NADH at 340 nm : $6.22 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Citrate synthase, CS (EC 2.3.3.1) : 100 mM imidazole-HCl, 0.1 mM DTNB, 0.1 mM acetyl CoA, 0.15 mM oxaloacetate (omitted for the control), pH 8. (Thibeault et al. 1997). Extinction coefficient of DTNB at 412 nm : $13.6 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Lactate dehydrogenase, LDH (EC 1.1.1.27) : 100mM potassium-phosphate, 0.16 mM NADH, 0.4 mM pyruvate, pH 7.0 (Thibeault et al. 1997). Extinction coefficient of NADH at 340 nm : $6.22 \text{ mmol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Chemicals

All chemicals were obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO, USA).

Statistical analysis

Statistical analysis were done using Systat 10.2 software (SPSS inc. 1998). In the aim of characterize the development of the energy metabolism and catabolic capacities of the developing spotted wolffish egg, the mean values of the studied variables (egg mass, egg protein content, enzymes activities and activities ratios) have been compared between stages of development using one way ANOVAs. The effect of parental crossing on enzyme activities was verified using nested ANOVAs with developmental stage nested within crossing. A multiple comparison test of Tukey was used when significant differences were observed. Coefficient of variation (CV) of egg enzyme activities and ratios activities within crossings and between crossings were calculated. Regression lines of enzyme activities at each developmental stages in relation to survival rate at eyed stage were plotted for each enzyme. Statistical test were considered significantly different at the 5% level.

2.4 Results

No significant differences were observed in mean egg weight between stages ($p=0.317$), while protein content (mg egg^{-1}) decreased significantly from stage 4 to

stage 6 (*Table 1*). Activity in individual eggs was detected at stage 4 for all of the catabolic and energy metabolism enzymes studied, with the exception of anaerobic glycolysis (LDH) and fatty acid oxidation (HOAD) enzymes, which were detected only from stage 5. The activity patterns of GDH (amino acids mobilization), HOAD, CS (aerobic pathway) and LDH (anaerobic glycolysis) showed a significant continuous increase during the developmental period studied, from stage 4 to stage 7 (stage 5 to stage 7 for LDH) (*Table 1*). PK (glycolysis) activity increased significantly from stage 4 to stage 6, with no differences between stage 6 and 7 ($p=0.874$). No significant differences were observed between stage 4 and 5 for the AAT (amino acids mobilization) and LIP activity ($p=0.085$ and $p=0.591$, respectively), but a continuous significant increase was detected from stage 5 to stage 7 (*Table 1*). LIP activity showed a particularly marked peak in activity at stage 7, relative to previous stages (*Table 1*). Activity significantly increased for TRY from stage 4 to stage 6 and then appeared to reach a plateau ($p=0.709$ between stage 6 and 7). Each enzyme studied exhibited a maximal rate of activity just before hatching (stage 7), except PK and TRY (*Table 1*).

The ratio of anaerobic to aerobic pathways (LDH/CS, *Figure 1*) revealed a significant faster relative increase in anaerobic capacity between stage 5 (4.23 ± 1.41) and 7 (8.23 ± 3.57). Anaerobic capacity also significantly increased at a faster relative rate than glycolytic capacity (LDH/PK: 0.86 ± 0.30 at stage 5 to 3.57 ± 1.43 at stage 7, *Figure 1*).

The relative capacity to use specific energy substrates for energy production changes during embryonic development (*Figure 2*). The evolution of the capacity to use carbohydrates showed a significant slower increase than the ability to mobilise amino acids (PK/AAT: 5.05 ± 2.45 at stage 4 to 1.25 ± 0.41 at stage 7) and fatty acids (PK/HOAD: 7.85 ± 3.50 at stage 5 to 4.12 ± 1.26 at stage 7). Also, the development of the amino acids catabolic capacity appeared significantly faster than the fatty acids capacity (AAT/HOAD) from stage 5 (2.00 ± 0.97) to stage 6 (2.89 ± 2.03). A look at the evolution of the potential contribution of each energy substrate to the aerobic mode of energy production during development showed that the capacity to oxidize carbohydrates (PK/CS) and fatty acids (HOAD/CS) significantly declined at the end of development (from stage 6 to stage 7: 5.09 ± 1.79 to 2.50 ± 0.86 for PK/CS and 0.76 ± 0.21 to 0.61 ± 0.18 for HOAD/CS), while the capacity to mobilize amino acids (AAT/CS) significantly rose between stage 5 (1.33 ± 0.52) and 6 (1.96 ± 0.99) (*Figure 3*). PK/CS and AAT/CS ratios were calculated for each family, even though CS activity was assayed on a different set of individuals than PK and AAT enzymes, because the eggs came from the same females.

Significant variability of activities were found between families, for each of the studied enzymes, within each developmental stages (see *Figure 4*, LDH and PK examples), with the exception of the stage 4 for GDH ($p=0.178$), stage 7 for LIP ($p=0.061$) and stage 6 for TRY ($p=0.087$). Coefficients of variation for TRY and LIP within crossings (TRY: 24.3 to 49.6 %, 15 to 59.6 %, 14.9 to 45.3 % and 4.8 to 39.9 % at stages 4, 5, 6 and 7 respectively; LIP: 18.3 to 63.3 %, 18.6 to 67.9 %, 9.2 to 67.2 %

and 25.3 to 97.4 % at stages 4, 5, 6 and 7 respectively) were higher than CV of all other enzymes and were also generally higher than CV between crossings (TRY: 33.3, 23.8, 17.9 and 26.3 % at stages 4, 5, 6 and 7 respectively; LIP: 36.8, 49.1, 38.6 and 40.7 % at stages 4, 5, 6 and 7 respectively). A similar pattern could be observed for HOAD and GDH. PK demonstrated the lowest CV within crossings (6.1 to 23 %, 5.9 to 28.6 %, 5.6 to 27.4 % and 8.8 to 54.7 % at stages 4, 5, 6 and 7 respectively) and for a majority of crossings, there were generally lower than CV between crossings (22.2, 47.5, 33.1 and 27.8 % at stages 4, 5, 6 and 7 respectively). AAT, CS and LDH showed the same tendency, in spite of a little more important variability within crossings.

Enzyme activities were slightly related to survival rates at eyed stage : AAT and CS at stage 4 ($r^2_{\text{AAT}}=0.264$ positive relation, $r^2_{\text{CS}}=0.093$ negative relation), HOAD at stage 5 ($r^2_{\text{HOAD}}=0.091$ neg. rel.), TRY at stage 7 ($r^2_{\text{TRY}}=0.133$ neg. rel.) and LDH at stages 6 and 7 ($r^2=0.153$ pos. rel., $r^2=0.195$ neg. rel., respectively). Significant relations between activity ratios and survival rates at eyed stage were also found : LDH/CS at stage 7 ($r^2=0.212$, neg. rel.), LDH/PK at stages 5 ($r^2=0.105$, neg. rel.) and 6 ($r^2=0.131$, pos. rel.), PK/AAT at stages 4 ($r^2=0.127$, neg. rel.) and 5 ($r^2=0.341$, pos. rel.), PK/HOAD at stages 5 ($r^2=0.175$, pos. rel.) and 6 ($r^2=0.093$, neg. rel.), PK/CS at stages 5 ($r^2=0.120$, pos. rel.) 6 ($r^2=0.131$, neg. rel.) and 7 ($r^2=0.132$, neg. rel.), AAT/CS at stage 4 ($r^2=0.203$, pos. rel.) and HOAD/CS at stage 7 ($r^2=0.109$, neg. rel.).

Table 1. Mass (g), protein content (mg) and activity of enzymes of energy metabolism and catabolic capacities (U g^{-1} protein) in individual Spotted wolffish eggs during embryonic development (SE=standard error)

	Developmental stages							
	stage 4		stage 5		stage 6		stage 7	
	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE	Mean	SE
Egg parameters								
Mass	0.105	0.016	0.108	0.015	0.107	0.014	0.109	0.013
Protein content	49.44 ^a	11.97	44.23 ^b	9.62	38.84 ^c	9.00	35.56 ^{cd}	8.13
<i>n</i> ¹	90		100		100		80	
Energy metabolism								
PK	2.44 ^a	0.62	7.62 ^b	3.80	15.40 ^c	5.36	14.74 ^{cd}	4.83
AAT	0.57 ^a	0.26	2.06 ^a	1.30	6.51 ^b	3.71	12.59 ^c	4.90
GDH	1.58 ^a	0.38	3.78 ^b	0.80	7.20 ^c	1.52	10.60 ^d	4.07
HOAD	-		0.98 ^a	0.33	2.31 ^b	0.67	3.59 ^c	1.02
CS	0.59 ^a	0.21	1.53 ^b	0.69	3.21 ^c	1.13	6.22 ^d	1.80
LDH	-		6.33 ^a	3.45	22.98 ^b	9.23	47.16 ^c	13.69
Catabolic enzymes								
TRY (*10 ⁻⁴)	3.41 ^a	1.59	5.60 ^b	2.20	7.23 ^c	2.20	6.73 ^{bcd}	2.52
LIP	0.14 ^a	0.08	0.54 ^a	0.33	1.46 ^b	0.83	5.09 ^c	3.45
<i>n</i> ²	45		50		50		40	

Different superscript letters indicate significantly different values for a given parameter (horizontal axis).

¹Number of eggs from the two sets of enzymes analysis (n=10 eggs from each parental crossing).

²Number of eggs from one of the two sets of enzymes analysis (n=5 eggs from each parental crossing).

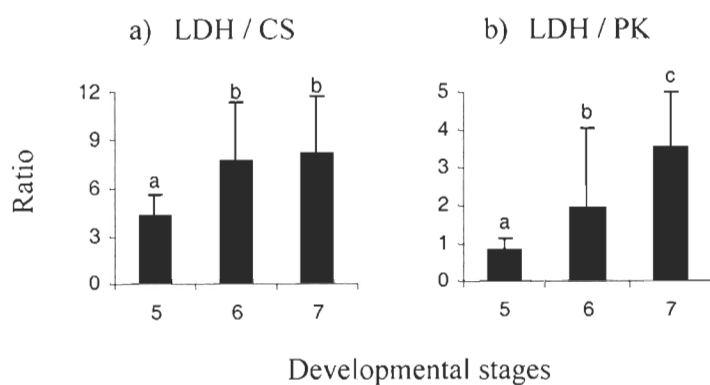


Fig. 1. Evolution of the a) anaerobic vs aerobic and b) anaerobic vs glycolytic pathways during embryonic development of *A. minor*. Results are given in mean \pm SE, n eggs = 50, 50 and 40 for stages 5, 6 and 7 respectively. Significant differences among stages are identified with different superscript letters

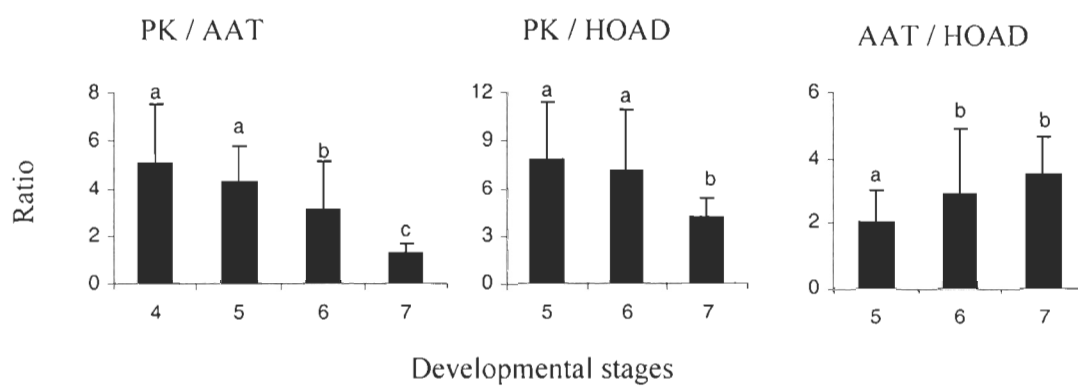


Fig. 2. Relative evolution of the use of energy fuels (carbohydrates PK, amino acids AAT, fatty acids HOAD) during embryonic development in *A. minor*. Results are given in mean \pm SE, n eggs = 45, 50, 50 and 40 for stages 4, 5, 6 and 7 respectively. Significant differences among stages are identified with different superscript letters

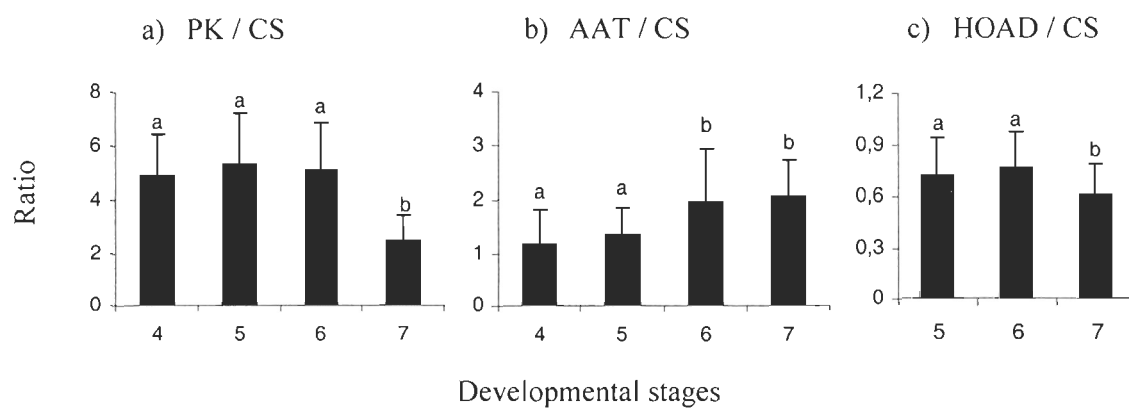


Fig. 3. Relative contribution of a) carbohydrates, b) amino acids and c) fatty acids to aerobic energy production during embryonic development in *A. minor*. Results are given in mean \pm SE, n eggs = 45, 50, 50 and 40 for stages 4, 5, 6 and 7 respectively. Significant differences among stages are identified with different superscript letters

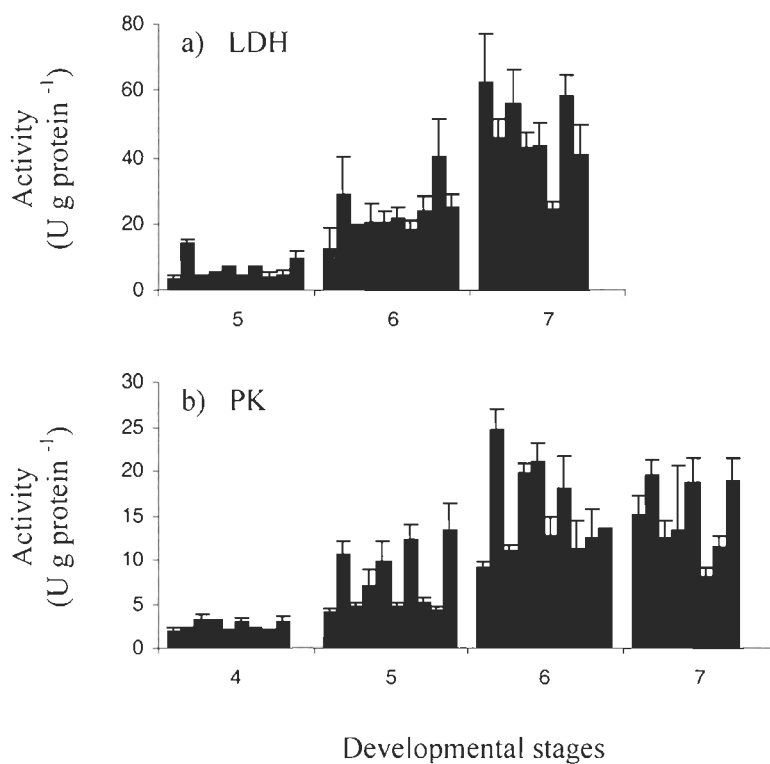


Fig. 4. Inter-familial variability in activities of a) LDH and b) PK during embryonic development in *A. minor*. Each bar represent a batch of eggs ($n=5$) coming from a particular parental crossing

2.5 Discussion

Transamination pathways, catalysed here by AAT and GDH, are reversible reactions. Transamination can remove the amine group from an amino acid, giving an α -ketonic acid, that can be introduced to the tricarboxylic acid cycle for *energy production*. The reverse reaction can also occur — an amine group can be added to an α -ketonic acid —, resulting in an amino acid that could be used for *protein synthesis*. Assuming that the main activity of the egg is to develop new tissues, it could be suspected that amino acids are used primarily in this anabolic process. However, the significant decrease in protein content during the developmental period studied suggests that amino acids are rather used for energy production. It was then taken into account that AAT and GDH activities are representatives of amino acids catabolism for ATP synthesis. Rønnestad et al. (1992) have reported a use of about 80 % of the whole free amino acids pool as energy metabolism and 20 % as precursors for body protein synthesis during turbot *Scophthalmus maximus* embryonic development. In the lemon sole *Microstomus kitt* eggs, these observations were of about 70 and 30 %, respectively (Rønnestad & Fyhn 1992).

2.5.1 A functional and increasing metabolic activity

Our results demonstrated that an enzymatic system for energy metabolism is functional from the eyed stage (350 degree days) to pre-hatching (900 degree days) of Spotted wolffish egg; enzymatic capabilities were detected for tricarboxylic acid cycle (CS), anaerobic glycolysis (LDH), glycolysis (PK), as well as for amino acids (AAT) and fatty acids (HOAD) catabolism. A recent study looking at metabolic capacities in Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*) eggs, just before hatching, could detect the same

metabolic pathways as studied here (Lamarre et al. 2004). Glycolytic and amino acids catabolic capabilities have been previously reported in the eggs of trout *Salmo trutta lacustris* (Lahnsteiner et al. 1999), of cyprinid fishes (Lahnsteiner et al. 2001) and gilthead sea bream *Sparus aurata* (Lahnsteiner & Patarnello 2003). Other mentions of glycolytic activity in eggs were made for the rainbow trout *Salmo gairdneri* (Termer 1968a, Boulekbache 1981, Matschak et al. 1998) and tricarboxylic acid cycle activity for sunfishes (Shaklee & Whitt 1977).

The gradual increase in activity, shown by all of the metabolic enzymes during ontogeny (*Table 1*), suggests the existence of a general pattern of embryo development. This parallel coordination of the development of different metabolic pathways seems logical during the early developmental stages of an organism under construction. Tissue growth and maintenance will require an increasing catabolic contribution as development progresses. Furthermore, the embryo must be prepared to respond to essential larval functions such as standard, active and post-prandial metabolism. Raising the activity of the tricarboxylic acid cycle (CS) during development is in accordance with the general increase in respiratory activity (VO_2) observed in developing fish eggs (Rombough 1988, Rønnestad et al. 1992, Finn et al. 1995a, Sivaloganathan et al. 1998, Parra et al. 1999). An increase in glycolytic metabolism during ontogeny, showed by NADP-dependent isocitrate dehydrogenase, has also been observed in the eggs of green sunfish *Lepomis cyanellus* and warmouth *L. gulosus* (Shaklee & Whitt 1977). To our knowledge, this is the first time that the evolution of the major metabolic pathways have been studied simultaneously and over such a long embryonic developmental period in fish eggs.

1). This suggests that the mobilisation of carbohydrates via anaerobic pathways increases during ontogeny.

2.5.3 Utilisation of energy fuels

The catabolic capacities observed during the second half of spotted wolffish egg development, suggests that each of the three energy fuels (carbohydrates, amino acids and fatty acids) can play a significant role in energy production during this period. Few studies have examined the evolution of energy catabolic pathways in developing fish embryos. When enzymatic pathways were studied, a constant level of activity has been reported until hatching in most studies. For the green sunfish *Lepomis cyanellus* and the warmouth *L. gulosus* eggs, Shaklee & Whitt (1977) have denoted a virtually constant level of activity of six different glycolytic enzymes (of which the PK) during embryo development. Closely similar pattern was observed for three enzymes of the glycolysis (of which the PK) as well as for AAT and GDH in the gilthead sea bream *Sparus aurata* eggs (Lahnsteiner & Patarnello 2003). Decreasing activity during development has also been observed, particularly for PK in eggs of trout (Boulekbache 1981). However, these earlier results do not concur with our observations, since in this study, catabolic capacities clearly increased from the middle to the end of egg development (*Table 1*), for the four pathways concerned (PK, AAT, GDH, HOAD). It is interesting to note however that the fish species used for the previous studies (green sunfish, warmouth and trout) are characterized by a relatively short embryonic developmental period, while wolffish eggs take more than 1000 degree days until hatch. A longer developmental period, as well as a larger egg size, can thus offer a considerable analytical advantage for a rigorous descriptive and ontogenic physiological approach : the possibility to

better distinct developmental stages during ontogeny and to detect clear differences in activity levels.

If the intensity of carbohydrates, amino acids and fatty acids breakdown increased through ontogeny, then their relative contribution to energy production appeared to evolve in different ways. The relative capacity to use carbohydrates seemed to decrease with development, both in terms of substrate oxidation capacity ratios (PK/AAT and PK/HOAD, *Figure 2*) and in its contribution to aerobic energy production (PK/CS ratio, *Figure 3*). In the case of amino acids, the relative capacity to use aspartate rose, compared to the carbohydrates (PK/AAT, *Figure 2*) and fatty acids (HOAD/AAT, *Figure 2*). It seems also to be showed by the AAT/CS ratio (*Figure 3*). This hypothesis could also be supported by the evident decrease in protein content during embryonic development (*Table 1*). Finally, the mitochondrial capacity to use fatty acids appeared to be relatively constant (HOAD/CS ratio, *Figure 3*) through our development period. The fact that HOAD activity could only be detected in individual eggs from stage 5, while PK, AAT and GDH could be measured at stage 4, is an indication that fatty acids contribution to energy production occurs later during development. The catabolic capacity to mobilize lipids (LIP) remained stable during development and did not change until stage 6 (before hatching), following by a considerable increase at stage 7 (*Table 1*). These comparisons between the contribution of various substrates to energy production suggest that the relative breakdown capacity of carbohydrates becomes increasingly less important during the second half of spotted wolffish embryonic development and this is compensated by an increase in the relative capacity to catabolise amino acids and fatty acids.

A number of studies have focused on the relative use of amino acids and fatty acids in energy production during development of fish eggs and young larvae. Finn et al. (1995c) suggested two general schemes for the sequence of catabolic substrate oxidation, relating them to whether or not the eggs contained oil globules. In species containing oil globules (ex: gilthead sea bream *Sparus aurata*, turbot *Scophthalmus maximus* and Senegal sole *Solea senegalensis*), amino acids appear to be the main energy substrate during embryonic development, followed by a significant use of fatty acids, derived from oil globule, after hatching (Rønnestad et al. 1992, Rønnestad et al. 1994, Parra et al. 1999), while for species without oil globules (ex: Atlantic cod *Gadus morhua*), fatty acids and amino acids both contribute to energy dissipation during the egg stage (Finn et al. 1995a, Finn et al. 1995b). Spotted wolffish eggs contain an oil droplet, which is still persistent in the newly hatched larvae (Falk-Petersen & Hansen 2003). Considering the observations made in this study, we can suggest that spotted wolffish egg adopts the sequential oxidation of different substrates attributed to the presence of an oil globule.

2.5.4 Degradation capacities

Enzymatic systems for protein and lipid degradation appeared to be active in developing eggs of spotted wolffish. To our knowledge, no published studies have yet looked at the catabolic capacities of fish eggs, except chorionase hatching enzyme (Lehninger et al. 1993). Trypsin-like proteolytic capacities, the most important enzyme in protein digestion in fish (Ueberschar 1988), appeared important from the middle of spotted wolffish egg development (*Table I*). This could be related to an early necessity to break proteins down for anabolic processes. As for proteins, triglyceride

mobilisation capacity increased between stage 4 and 7, but a particular increase was observed just before hatching (*Table 1*). It is interesting to relate this to the apparent contribution of fatty acids to energy production (HOAD) later in development. This increasing capacity to mobilise triglyceride, just before hatching, could be attributed to wolffishes ability to rely on exogenous feeding, right at the beginning of larval life (Moksness et al. 1989). At hatching, larva show a relative advanced stage of development. Their yolk reserve is nearly exhausted and they must rely on their capacity to digest exogenous food for survival. It is known that common wolfish, a closely related species, hatch with fully functional organ associated with the digestive tract and excretion — stomach, gastric glands, pancreatic tissues and liver with vacuolized hepatocytes (Falk-Petersen & Hansen 2001). The presence of the main digestive enzyme functions (carbohydrates, proteins and lipids) has also been reported in a recent study on the early life of larval common wolffish (Le François et al. 2000).

2.5.5 Inter-familial variations of enzymatic parameters

Significant variations in activity between batches of eggs (crossings) were observed for all of the metabolic and digestive pathways assayed here. Furthermore, since coefficient of variations were generally higher between than within crossings in the case of PK, AAT, CS and LDH, and considering that the eggs obtained from each parental crossing were subjected to similar post-fertilisation conditions, we can see the possibility of a parental effect on the energy metabolism of the egg. However, only slight significant linear relations could be detected between metabolic parameters or activity ratios and embryonic survival rates at the eyed stage. We suspect that survival at this developmental stage might not be representative of the quality of the egg.

Survival at hatching, being closer to the end of the critical period for survival, could be more helpful in making such relations. Nevertheless, the evident variability between families observed here are promising for the development of future research efforts on the identification of metabolic indicators of egg quality in Spotted wolffish. Metabolic pathways for carbohydrates (PK) and amino acids catabolism (AAT), as well as for aerobic (CS) and anaerobic (LDH) energy production, seem particularly interesting considering the good variability between crossing, compare to the variability of activities within the different batches of eggs.

2.6 Acknowledgements

This research was supported by the Conseil de Recherche en Pêcheries et Agriculture du Québec (P. Blier and N. Le François) and by the Ministère de l'Agriculture des Pêcheries et de l'Alimentation du Québec.

CHAPITRE TROISIÈME

CONCLUSION

L'objectif de cette étude consistait en une approche relativement nouvelle dans le domaine de la physiologie des jeunes stades de poissons marins. Les analyses ayant été menées ici, portant sur un grand nombre de voies métaboliques, ont permis de dresser un schéma général du métabolisme embryonnaire chez une espèce pour laquelle la taille de l'œuf est relativement importante et dont la période de développement de ce dernier est relativement longue, soit environ 1000 degré jour. L'étude comparative de quatre stades de développement subséquents, définis arbitrairement (350 *stade 4*, 540 *stade 5*, 720 *stade 6* et 900 *stade 7* degrés jour suivant la fertilisation), a permis de suivre l'évolution de ce métabolisme, du stade oeillé (stade 4) jusqu'à la pré-éclosion de l'œuf (stade 7).

La seconde moitié du développement embryonnaire de *A. minor* est caractérisée par la présence fonctionnelle de systèmes enzymatiques du métabolisme énergétique et des capacités cataboliques : durant la seconde partie de son développement (stades 4 à 7), l'œuf semble avoir la capacité de produire son énergie par mode aérobie et anaérobie, ainsi qu'à utiliser les substrats énergétiques que sont les glucides, les acides aminés et les acides gras, afin de produire cette énergie. L'impossibilité à détecter l'activité de la voie d'oxydation des acides gras au tout début de la période de

développement étudiée, laisse toutefois croire que la capacité d'oxydation de ce substrat apparaîtrait un peu plus tardivement au cours du développement. Ceci concorde bien avec l'augmentation marquée de la capacité à dégrader les lipides (LIP), qui survient de façon significative seulement à la fin du développement (stade 7), alors que l'animal doit se préparer à une vie larvaire caractérisée par une alimentation exogène très précoce, soit quelques jours suivant l'éclosion. La capacité de dégradation des protéines (TRY), quant à elle, semble bien installée depuis le début de la seconde moitié du développement de l'œuf et augmente de façon significative du stade 4 au stade 6, après quoi elle demeure constante jusqu'à l'éclosion. Ceci peut sans doute s'interpréter par un besoin de remanier les protéines de réserves, qui serviront de matière de structure pour l'organisme en croissance. La voie de dégradation des glucides (PK) suit également le même patron que la TRY. Finalement, les capacités aérobie (CS) et anaérobie (LDH), ainsi qu'à mobiliser les acides aminés (AAT et GDH) et les acides gras (HOAD), augmentent graduellement de façon significative tout au long du développement, pour atteindre leur maximum juste avant l'éclosion (stade 7).

La voie anaérobie semble jouer un rôle non négligeable au niveau de la production énergétique de l'œuf de Loup tacheté, alors que la littérature insiste presque exclusivement sur la voie aérobie dans le cas d'autres espèces déjà étudiées. Le ratio de l'activité anaérobie sur l'activité aérobie (LDH/CS) démontre que la capacité à produire de l'énergie par mode anaérobie augmente significativement plus rapidement que par mode aérobie avec l'avancement du développement, les valeurs du ratio passant de 4.23 ± 1.41 au stade 5 à 8.23 ± 3.57 au stade 7. Cette importance particulière qui semble être accordée au métabolisme anaérobie peut être mise en relation avec la capacité, bien

connue pour la jeune larve de Loup, de se déplacer par mouvements brefs mais intenses («burst swimming» : mode anaérobie) lors des activités d'alimentation.

Les ratios comparant l'évolution de l'utilisation relative des différents substrats énergétiques et leur contribution à la voie de production d'énergie aérobie, suggèrent un certain patron d'oxydation de ces substrats. La capacité à mobiliser les glucides augmentent significativement plus lentement que la capacité à utiliser les acides aminés (PK/AAT; 5.05 ± 2.45 au stade 4 à 1.25 ± 0.41 au stade 7), ainsi que les acides gras (PK/HOAD; 7.85 ± 3.50 au stade 5 à 4.12 ± 1.26 au stade 7). Pour leur part, les ratios comparant la contribution relative des trois substrats énergétiques à la production d'énergie par mode aérobie révèlent une diminution significative de la contribution des glucides (PK/CS, 5.09 ± 1.79 au stade 6 à 2.50 ± 0.86 au stade 7) et des acides gras (HOAD/CS, 0.76 ± 0.21 au stade 6 à 0.61 ± 0.18 au stade 7), mais une augmentation significative de la contribution des acides aminés (AAT/CS, 1.33 ± 0.52 au stade 5 à 1.96 ± 0.99 au stade 6) avec l'avancement du développement. Il ressort de l'évolution relative de ces ratios d'activité que les glucides perdraient graduellement de l'importance en tant que substrat énergétique au cours du développement de l'oeuf, alors que les acides gras et principalement les acides aminés, deviendraient de plus en plus importants. Ce patron d'utilisation des substrats énergétiques, soit une préférence des acides aminés au cours du développement embryonnaire, suivie d'une utilisation des acides gras principalement suite à l'éclosion, concorde bien avec celui défini pour les espèces dont l'œuf possède une globule lipidique, ceci étant le cas du Loup de mer.

Des variations d'activités significatives entre les groupes d'œufs provenant des différentes familles ont pu être observées et ce, pour la totalité des enzymes étudiées ici. Aussi, dans le cas des voies de production énergétique aérobie (CS) et anaérobie (LDH), de même que de mobilisation des acides aminés (AAT) et particulièrement des glucides (PK), les variations d'activités se sont avérées généralement plus importantes entre les familles qu'à l'intérieur des familles, laissant présumer un effet parental sur le métabolisme embryonnaire. Malgré ces différences d'activité entre les familles, celles-ci n'ont pu être reliées significativement au taux de survie (au stade oeillé) de l'œuf que dans quelques cas (AAT et CS au stade 4, HOAD au stade 5, TRY au stade 7 et LDH aux stades 6 et 7). La majorité des ratios d'activité ont aussi démontré une telle relation linéaire, mais seulement à certains stades spécifiques, ne démontrant pas de tendance particulière s'appliquant à la période complète de développement. Il faut donc envisager la possibilité que le taux de survie au stade oeillé ne soit pas fidèlement représentatif de la qualité de l'œuf.

La présente étude, en démontrant la possibilité d'une caractérisation relativement fine du développement métabolique de l'œuf, de même que des différences significatives de ces paramètres métaboliques d'une famille à l'autre, laisse entrevoir une perspective intéressante quant à l'identification d'indicateurs de qualité enzymatique chez l'œuf de Loup tacheté. Si tous les paramètres étudiés ici variaient d'une famille à l'autre, il faudra déterminer si la qualité de l'œuf peut être reflétée plus fidèlement par l'activité d'une voie métabolique en particulier, ou par un ensemble de ces voies. Les voies métaboliques de dégradation des glucides (PK) et des acides aminés (AAT), ainsi que les voies de production d'énergie par mode aérobie (CS) et

anaérobie (LDH), semblent particulièrement intéressantes si l'on tient compte que les variations d'activité s'avéraient relativement plus importantes entre les familles qu'entre les œufs provenant d'un croisement particulier. La validation des indicateurs par le taux de survie de l'œuf à l'éclosion (auquel nous n'avons pas accès) et surtout, par les performances larvaires (survie, croissance), devrait être étudiée de façon plus approfondie puisque ce dernier stade constitue la fin de la période critique du cycle de vie, en terme de taux de survie.

BIBLIOGRAPHIE

- Baskerville-Bridges, B. & L.J. Kling. 1996. Weaning of Atlantic cod (*Gadus morhua*) larvae onto a commercial microparticulate diet. Bull. Aquacul. Assoc. Canada 96-3 : 27.
- BCDA. 2003. (Page consultée en juin 2004). Énoncé de la vision, [En ligne], URL:<http://www.ocad-bcda.gc.ca/fvision.html>.
- Blier, P.U., D. Pelletier & J.D. Dutil 1997. Does aerobic capacity set a limit on fish growth rate? Reviews in Fisheries Science 5: 323-340.
- Borlongan, I.G. 1990. Studies on the digestive lipases of milkfish, *Chanos chanos*. Aquaculture 89: 315-325.
- Boulekbache, H. 1981. Energy metabolism in fish development. American Zoologist 21: 377-389.
- Bromage, N.R., M. Bruce, N. Basavaraga, K. Rana, R. Shields, C. Young, J. Dye, P. Smith, M. Gillespie & J. Gamble. 1994. Egg quality determinants in finfish: the role of overripening with special reference to the timing of stripping in the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus*. Journal of the World Aquaculture Society 25: 13-21.
- Bromage, N.R. & R.J. Roberts. 1995. Broodstock management and seed quality - General consideration. pp. 1-24. In: N.R. Bromage & R.J. Roberts (ed.) Broodstock management and egg and larval quality, Institute of Aquaculture, Blackwell Science, Massachusetts, USA.
- Brown, J., M. Helm & J. Moir. 1995. New-candidate species for aquaculture. pp. 341-362. In: A.D. Boghen (ed.) Cold-water aquaculture in Atlantic Canada, The Canadian Institute for Research on Regional Development, Sackville, N.B.

- Carnevali, O., G. Mosconi, M. Cardinali, I. Meiri & A. Polzonetti-Magni. 2001. Molecular components related to egg viability in the Gilthead sea bream, *Sparus aurata*. *Molecular Reproduction and development* 58: 330-335.
- Cetta, C.M. & J.M. Capuzzo. 1982. Physiological and biochemical aspects of embryonic and larval development of the Winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*. *Marine Biology* 71: 327-337.
- Craik, J.C.A. & S.M. Harvey. 1984. Biochemical changes associated with overripening of the eggs of Rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Aquaculture* 37: 347-357.
- Dixon, M., E.C. Webb, C.J.R. Thorne & K.F. Tipton. 1979. *Enzymes*. Academic Press, New York. 1116 pp.
- Dutil, J.-D., C. Cantin, P. Lauzier, M. Naud, J. Munro & R. Bailey. 1989. L'élevage de la morue franche, *Gadus morhua* : réalités biologiques et économiques. *Rap. Can. Ind. Sci. Halieut. Aquat.* No 200. 41 pp.
- Espelid, S. 2002. Susceptibility of Spotted wolffish to infectious diseases and use of immunoprophylaxis. *Bulletin of Aquaculture Association of Canada* 102: 37-38.
- Evans, R.P., C.C. Parrish, P. Zhu, J.A. Brown & P.J. Davis. 1998. Changes in phospholipase A₂ activity and lipid content during early development of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Marine Biology* 130: 369-376.
- Falk-Petersen, I.B. & T.K. Hansen. 2001. Organ differentiation in newly hatched common wolffish. *Journal of Fish Biology* 59: 1465-1482.
- Falk-Petersen, I.B. & T.K. Hansen. 2003. Early ontogeny of the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen). *Aquaculture Research* 34: 1059-1067.
- Falk-Petersen, I.B., T.K. Hansen, R. Fieler & L.M. Sunden. 1999. Cultivation of the spotted wolf fish *Anarhichas minor* (Olafsen) - a new candidate for cold-water fish farming. *Aquaculture Research* 30: 711-718.
- Fauvel, C., M.H. Omnes, M. Suquet & Y. Normant. 1992. Enhancement of the production of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae by controlling overripening in mature females. *Aquaculture and Fisheries Management* 23: 209-216.

- Finn, R.N., H.J. Fyhn & M.S. Evjen. 1995a. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). I. Respiration and nitrogen metabolism. *Marine Biology* 124: 355-369.
- Finn, R.N., J.R. Henderson & H.J. Fyhn. 1995b. Physiological energetics of developing embryos and yolk-sac larvae of Atlantic cod (*Gadus morhua*). II. Lipid metabolism and enthalpy balance. *Marine Biology* 124: 371-379.
- Finn, R.N., I. Rønnestad & H.J. Fyhn. 1995c. Respiration, nitrogen and energy metabolism of developing yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology* 111A: 647-671.
- Finn, R.N., J. Widdows & H.J. Fyhn. 1995d. Calorespirometry of developing embryos and yolk-sac larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Biology* 122: 157-163.
- Halfyard, L.C. & C.C. Parrish. 2002. Biochemical analysis of egg quality and first-feeding condition of the common wolffish *Anarhichas lupus*. Proceedings of a wolffish culture workshop. Wolffish culture : a productive partnership - a workshop held at Rimouski, Québec, Juin 2002. *Bull. Aquacult. Assoc. Can.* 102(2): 33-36, 2002.
- Halfyard, L.C., C.C. Parrish, J. Watkins & K. Jauncey. 2000. Fatty acid and amino acid profiles of eggs from the Common wolffish, *Anarhichas lupus*. *Aquaculture Association of Canada Spec. Publ.*: 60-63.
- Haug, T. 1990. Biology of the Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L. 1758). In : *Advances in marine biology*. J.H.S. Blaxter and A.J. Southward (eds). Vol 26. 314 pp.
- Holmefjord, I. & I. Lein. 1990. Natural spawning of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) in captivity. *ICES C.M.* 1990/F: 74. Mariculture committee. 4 pp.
- Izquierdo, M.S. & R.J. Henderson. 1998. The determination of lipase and phospholipase activities in gut contents of turbot (*Scophthalmus maximus*) by fluorescence-based assays. *Fish Physiology and Biochemistry* 19: 153-162.

- Jobling, M. & T. Pedersen. 1995. Cultivation of the Atlantic cod. In : Production of Aquatic Animals. Nash, C.E., Novotny, A.J. (eds). Elsevier, Amsterdam, pp. 347-356.
- Kjørsvik, E. 1994. Egg quality in wild broodstock cod *Gadus morhua* L. Journal of the World Aquaculture Society 25: 22-28.
- Kjørsvik, E., K. Hoehne-Reitan & K.I. Reitan. 2003. Egg and larval quality criteria as predictive measures for juvenile production in turbot (*Scophthalmus maximus* L.). Aquaculture 227: 9-20.
- Kjørsvik, E. & I. Holmefjord. 1995. Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) and cod (*Gadus morhua*). In: Bromage, N.R., R. J. Roberts (eds), Broodstock management and egg and larval quality. Blackwell Oxford. pp. 169-196.
- Kjørsvik, E., S. Lønning. 1983. Effects of egg quality on normal fertilization and early development of the cod, *Gadus morhua* L. Journal of Fish Biology. 23: 1-12.
- Kjørsvik, E., A. Mangor-Jensen & I. Holmefjord. 1990. Egg quality in fishes. pp. 71-113. In: A. Press (ed.) Advances in Marine Biology, New York.
- Kjørsvik, E., A. Stene, S. Lønning. 1984. Morphological, physiological and genetical studies of egg quality in cod (*Gadus morhua* L). In : Dahl, E., D.S. Danielssen, E. Moksness, P. Solemdal (Eds), The Propagation of Cod *Gadus morhua* L. Flødevigen rapportserie. Vol.1, pp. 67-86
- Koven, W.M., J. Henderson & J. Sargent. 1994. Lipid digestion in turbot (*Scophthalmus maximus*) II : Lipolysis in vitro of ¹⁴C-labelled triacylglycerol, cholesterol ester and phosphatidylcholine by digesta from different segments of the digestive tract. Fish Physiology and Biochemistry 13: 275-283.
- Lahnsteiner, F. & P. Patarnello. 2003. Investigations on the metabolism of viable and nonviable gilthead sea bream (*Sparus aurata*) eggs. Aquaculture 223: 159-174.
- Lahnsteiner, F. & R.A. Patzner. 2002. Rainbow trout egg quality determination by the relative weight increase during hardening: a practical standardization. Journal of Applied Ichthyology 18: 24-26.
- Lahnsteiner, F., B. Urbanyi, A. Horvath & T. Weismann. 2001. Bio-markers for egg quality determination in cyprinid fish. Aquaculture 195: 331-352.

- Lahnsteiner, F., T. Weismann & R.A. Patzner. 1999. Physiological and biochemical parameters for egg quality determination in lake trout, *Salmo trutta lacustris*. *Fish Physiology and Biochemistry* 20: 375-388.
- Lamarre, S., N.R. LeFrançois, I.-B. Falk-Petersen & P.U. Blier. 2004. Can digestive and metabolic enzyme activity levels predict growth rate and survival of newly hatched Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus* Olafsen)? *Aquaculture Research* 35(6): 608-613
- Le François, N.R., M. Desjardins & P.U. Blier. 2004. Enhancement of profitability perspectives of wolffish cultivation by the extractoin of high value biomolecules, In: Shahidi, F., B.K. Simpson (eds), *Seafood Quality and Safety : Advances in the new millenium*. ScienceTech Publishing Co, St-John's, NFL, pp. 61-69.
- Le François, N.R., H. Lemieux & P.U. Blier. 2002. Biological and technical evaluation of the potential of marine and anadromous fish species for cold-water mariculture. *Aquaculture Research* 33(2): 95-108
- Le François, N.R., H. Lemieux, P.U. Blier & I.-B. Falk-Petersen. 2000. Effect of three different feeding regimes on growth, metabolism and digestive enzyme activities, in the early life of Atlantic wolffish (*Anarhichas lupus*). *Aquaculture Association of Canada Spec. Publ.*: 53-56.
- Lehninger, A.L., D.L. Nelson & M.M. Cox. 1993. *Principes de biochimie*. Worth Publisher, New York. 1035 pp.
- Lie, O., E. Lied & G. Lambertsen. 1987. Lipid digestion in cod (*Gadus morhua*). *Comparative Biochemistry and Physiology* 88B: 697-700.
- MAPAQ. 2003. (Page consultée en juin 2004). Énoncé de la Politique, [En ligne], URL:<http://www.agr.gouv.qc.ca/pac/publications/pdf/CAP/politique.pdf>.
- Matschak, T.W., D.D. Tyler & N.C. Stickland. 1998. Metabolic enzyme activities in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) embryos respond more to chronic changes in oxygen availability than to environmental temperature. *Fish Physiology and Biochemistry* 18: 115-123.
- McCarthy, I., E. Moksness & D.A. Pavlov. 1998. The effects of temperature on growth rate and growth efficiency of juvenile common wolffish. *Aquaculture International* 6: 207-218.

- McEvoy, L.A. 1984. Ovulatory rhythms and over-ripening of eggs in cultivated turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Journal of Fish Biology* 24: 437-448
- Moksness, E. 1994. Growth rates of the common wolffish, *Anarhichas lupus* L., and spotted wolffish, *A. minor* Olafsen, in captivity. *Aquaculture and Fisheries Management* 25: 363-371.
- Moksness, E., J. Gjosaeter, A. Reinert & S. Ingvard. 1989. Start-feeding and on-growing of wolffish (*Anarhichas lupus*) in the laboratory. *Aquaculture* 77: 221-228.
- Moksness, E. & D.A. Pavlov. 1996. Management by life cycle of wolffish, *Anarhichas lupus* L., a new species for cold-water aquaculture: a technical paper. *Aquaculture Research* 27: 865-883.
- Neidig, C.L., D.P. Skapura, H.J. Grier & C.W. Dennis. 2000. Techniques for spawning common snook: broodstock handling, oocyte staging, and egg quality. *North American Journal of Aquaculture* 62: 103-113.
- Nocillado, J.N., V.D. Penaflorida & I.G. Borlongan. 2000. Measures of egg quality in induced spawns of the Asian sea bass, *Lates calcarifer* Bloch. *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 1-9.
- Olsen, Y. 1997. Larval-rearing technology of marine species in Norway. *Hydrobiologia* 358: 27-36.
- Ouellet, P., Y. Lambert & I. Bérubé. 2001. Cod egg characteristics and viability in relation to low temperature and maternal nutritional condition. *ICES Journal of Marine Science* 58: 672-686.
- Parra, G., I. Rønnestad & M. Yufera. 1999. Energy metabolism in eggs and larvae of the Senegal sole. *Journal of Fish Biology* 55: 205-214.
- Pavlov, D.A. 1994. Maturation and artificial fertilization of eggs of captive common wolffish, *Anarhichas lupus* L. from the White sea. *Aquaculture and Fisheries Management* 25: 891-902.
- Pavlov, D.A. & E. Moksness. 1994a. Production and quality of eggs obtained from Wolffish (*Anarhichas Lupus* L.) reared in captivity. *Aquaculture* 122: 295-312.

- Pavlov, D.A. & E. Moksness. 1994b. Reproductive biology, early ontogeny, and effect of temperature on development in wolffish: comparison with salmon. *Aquaculture International* 2: 133-153.
- Pavlov, D.A. & E. Moksness. 1996a. Repeat sexual maturation of wolffish (*Anarhichas lupus* L.) broodstock. *Aquaculture* 139: 249-263.
- Pavlov, D.A. & E. Moksness. 1996b. Swelling of wolffish, *Anarhichas lupus* L., eggs and prevention of their adhesiveness. *Aquaculture Research* 27: 421-428.
- Pavlov, D.A. & E. Moksness. 1997. Development of the axial skeleton in wolffish, *Anarhichas lupus* (Pisces, Anarhichadidae), at different temperatures. *Environmental Biology of Fishes* 49: 401-416.
- Pavlov, D.A. & G.G. Novikov. 1986. On the development of biotechnology for rearing of white sea wolffish, *Anarhichas lupus marisalbi*. 1. Experience on obtaining mature sex products, incubation of eggs and rearing of the young fish. *Voprosy Ikhtiologii* 3: 476-487.
- Pelletier, D., J.-D. Dutil, P.U. Blier & H. Guderley. 1994. Relation between growth rate and metabolic organization of white muscle, liver and digestive tract in cod, *Gadus morhua*. *Journal of Comparative Physiology* 164 B: 173-190.
- Rime, H., N. Guitton, C. Pineau, E. Bonnet, J. Bobe & B. Jalabert. 2004. Post-ovulatory ageing and egg quality: a proteomic analysis of rainbow trout coelomic fluid. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:26.
- Roberts, I.M. 1985. Hydrolysis of 4-methylumbelliferyl butyrate: A convenient and sensitive fluorescent assay for lipase activity. *Lipids* 20: 243-247.
- Rombough, P.J. 1988. Respiratory gas exchange, aerobic metabolism, and effects of hypoxia during early life. pp. 59-161. In: W.S. Hoar & D.J. Randall (ed.) *Fish Physiology. The Physiology of developing Fish. Vol 11. Part A. Eggs and larvae*, Academic Press, Inc., Toronto.
- Rønnestad, I., H.J. Fyhn. 1992. Ammonia excretion and oxygen uptake related to catabolism of free amino acids in larvae of three flatfishes [(Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*), turbot (*Scophthalmus maximus*) and lemon sole (*Microstomus kitt*)]. In: Walther, B.T., H.J. Fyhn (eds). *Physiology and biochemistry of marine fish larvae*. University of Bergen, Bergen, Norway.

- Rønnestad, I., H.J. Fyhn & K. Gravningen. 1992. The importance of free amino-acids to the energy-metabolism of eggs and larvae of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Marine Biology* 114: 517-525.
- Rønnestad, I., W.M. Koven, A. Tandler, M. Harel & H.J. Fyhn. 1994. Energy metabolism during development of eggs and larvae of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Marine Biology* 120: 187-196.
- Rønnestad, I., W. Koven, A. Tandler, H. Mordechai & H.J. Fyhn. 1998. Utilisation of yolk fuels in developing eggs and larvae of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Aquaculture* 162: 157-170.
- Shaklee, J.B. & G.S. Whitt. 1977. Patterns of enzyme ontogeny in developing sunfish. *Differentiation* 9: 85-95.
- Shields, R.J., N.P. Brown & N.R. Bromage. 1997. Blastomere morphology as a predictive measure of fish egg viability. *Aquaculture* 155: 1-12.
- Sivaloganathan, B., J. Walford, Y.K. Ip & T.J. Lam. 1998. Free amino acids and energy metabolism in eggs and larvae of seabass, *Lates calcarifer*. *Marine Biology* 131: 695-702.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson & D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchonionic acid. *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
- Sutherland, R. 1997. Review of the economics of potential systems for farmed production. *Aquac. Eur.* 21(4): 6-11.
- Terner, C. 1968a. Studies of metabolism in embryonic development. III. Glycogenolysis and gluconeogenesis in trout embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology* 25: 989-1003.
- Terner, C. 1968b. Studies of metabolism in embryonic development. I. The oxidative metabolism of unfertilized and embryonated eggs of the Rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* 24: 933-940.
- Thibeault, M., P.U. Blier & H. Guderley. 1997. Seasonal variation of muscle metabolism organization in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry* 16: 139-155.

- Tietz, N.W. 1986. Textbook of Clinical Chemistry. W. B. Saunders Company, Toronto. 1919 pp.
- Tilseth, S. 1990. New marine fish species for cold-water farming. *Aquaculture* 85: 235-245.
- Tveiten, H. & H.K. Johnsen. 1999. Temperature experienced during vitellogenesis influences ovarian maturation and the timing of ovulation in common wolffish. *Journal of Fish Biology* 55: 809-819.
- Tveiten, H., S.E. Solevag & H.K. Johnsen. 2001. Holding temperature during the breeding season influences final maturation and egg quality in common wolffish. *Journal of Fish Biology* 58: 374-385.
- Ueberschar, B. 1988. Determination of the nutritional condition of individual marine fish larvae by analyzing their proteolytic enzyme activities with a highly sensitive fluorescence technique. *Meeresforschung/rep. MAR. RES* 32: 144-154.
- Ueberschar, B. & C. Clemmesen. 1992. A comparison of the nutritional condition of herring larvae as determined by two biochemical methods - tryptic enzyme activity and RNA/DNA ratio measurements. *ICES Journal of Marine Science* 49: 245-249.
- Waiwood, K.G., J. Reid & K. Howes. 1997. Canadian perspective on halibut culture. In : Cold water aquaculture to the year 2000. *Aquacult. Assoc. Can. Spec. Pub. No.2*. M.D. Burt and S.L. Waddy (eds). St-Andrews. pp. 43-45.
- Wendling, N.C., D.C. Bencic, J.J. Nagler, J.G. Cloud & R.L. Ingermann. 2000. Adenosine triphosphate levels of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) eggs following in vitro maintenance and activation/fertilization. *Fish Physiology and Biochemistry* 22: 217-223.